EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

SOYA İÇEREN İŞLENMİŞ GIDALARDA GDO MİKTARININ BELİRLENMESİ VE PİŞİRME KOŞULLARININ GDO MİKTARINA ETKİSİ

Gönül GÜVEN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ali ÜREN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.01.00
Sunuş Tarihi : 26.09.2014

Bornova-İZMİR
2014

Gönül GÜVEN tarafından Doktora tezi olarak sunulan "Soya İçeren İşlenmiş Gıdalarda GDO Miktarının Belirlenmesi ve Pişirme Koşullarının GDO Miktarına Etkisi" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26.09.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:		**İmza**
Jüri Başkanı	**: Prof. Dr. Ali ÜREN**	....
Raportör Üye	**: Yrd. Doç. Dr. Özgül ÖZDESTAN**	....
Üye	**: Prof. Dr. Neriman BAĞDATLIOĞLU**	....
Üye	**: Doç. Dr. İhsan YAŞA**	....
Üye	**: Yrd. Doç. Dr. Özlem ÇAĞINDI**	....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum "Soya İçeren İşlenmiş Gıdalarda GDO Miktarının Belirlenmesi ve Pişirme Koşullarının GDO Miktarına Etkisi" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 / 09 / 2014

Gönül GÜVEN

ÖZET

SOYA İÇEREN İŞLENMİŞ GIDALARDA GDO MİKTARININ BELİRLENMESİ VE PİŞİRME KOŞULLARININ GDO MİKTARINA ETKİSİ

GÜVEN, Gönül

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali ÜREN
Eylül 2014, 160 sayfa

Bu araştırmada soya içeren işlenmiş gıdalardan 20'şer adet soyalı mantı, soya unu ve bisküvi numunelerinden üç farklı yöntemle DNA izolasyonları yapılmış, ürün bazında yöntemler karşılaştırılmıştır. Piyasadan temin edilen bu numunelerde GDO tarama analizi Eurofins Gene Scan kit protokolüne göre yapılmıştır. 20 adet bisküvi numunesinin hiçbirinde GDO "Tespit Edilmemiştir", soyalı mantılardan 2 tanesinde ve soya unlarının 7 tanesinde GDO "Tespit Edilmiştir". Pozitif bulunan numunelerde soyaya ait üç gen bölgesi taranmış ve mantı numunelerinde MON 40-3-2, soya unu numuneleride MON40-3-2 ve MON89788 genleri tespit edilmiştir. Bu iki gen için miktar analizleri yapılmıştır.

Tez projesinin ikinci kısmında analiz edilen GDO miktarının pişirme ile nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla belirli oranda GDO içeren soya unu katılarak yapılan roll ekmekler laboratuvar koşullarında pişirilmiştir. Roll ekmekler 220°C, 250°C, 280°C'de farklı sürelerde pişirilmiş ve soya ununda, yoğurma sonunda hamurda, fermentasyon sonunda hamurda ve pişirilen farklı sıcaklık ve sürelerdeki örneklerde, MON40-3-2 ve MON89788 miktar analizleri yapılmıştır. Kullanılan soya ununda başlangıçta %97,19 MON40-3-2, %2,06 MON89788 analiz edilirken fermentasyon ve pişirme ile analiz edilen %GDO miktarının azaldığı gözlenmiştir. Farklı sıcaklık ve sürede pişirilen örneklerin %GDO değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Ayrıca roll ekmeklere ekmek yapımında kullanılabilecek farklı katkı maddeleri, baharatlar katılmış ancak bunların analiz edilen %GDO'ya herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

Anahtar sözcükler: Soya, GDO, MON40-3-2, MON89788.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GMO CONTENT OF FOOD CONTAINING SOY AND EFFECTS OF BAKING CONDITIONS TO GMO CONTENT

GÜVEN, Gönül

PhD Thesis in Food Engineering Department
Supervisor: Prof. Dr. Ali ÜREN
September 2014, 160 pages

In this research, DNA was isolated with three different isolation methods for 20 of manti with soy, soy flour and biscuit samples which are processed foods containing soy and methods are compared on product basis. GMO screen analysis was performed according to Eurofins Gene Scan kit protocol in the samples obtained randomly from the market. GMO was “not detected” at none of 20 biscuit samples, GMO was “detected” at two of manti with soy samples and seven of soy flour samples. Three soy events were screened at GMO positive samples and MON 40-3-2 was detected in manti samples and MON40-3-2 and MON89788 events was detected in soy flour samples.

In the second part of this thesis project, known amount of GMO containing soy flour added roll breads were baked at laboratory conditions in order to determine the change of analysed GMO content with baking. Roll breads are baked at 220°C, 250°C, 280°C at three different time and MON40-3-2 and MON89788 analysis were performed in soy flour, dough, dough after fermentation and samples baked at different temperature and time. While 97,19% of MON40-3-2 and 2,06% MON89788 were analysed in soy flour at the begining, it is determined that GMO percentage has decreased with fermentation and baking. Statistically important differences were determined between samples baked at different temperature and time. Besides, different food additives and spices that can be used in bread were added to roll breads but no effect was detected to analysed GMO%.

Keywords: Soy, GMO, MON40-3-2, MON89788.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince bana değerli görüş ve katkılarıyla yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÜREN'e,

Tez projemin deneme deseninin oluşturulmasında fikir veren değerli hocam Sayın Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya

Tez projeme maddi destekte bulunan; SYN Biyoteknoloji ve Dış Tic. Ltd. Şti, İntron Sağlık Ürünleri İthalat İhracat Ltd. Şti., ATQ Biyoteknoloji İç ve Dış Ticaret Ltd.Şti., Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri Ltd. Şti., Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)' ne,

Çalışmakta olduğum İzmir Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü' ne ve Moleküler Biyoloji Birimi personeline,

Eğitimim için her türlü fedakarlığı gösteren, hayatım boyunca desteklerini ve sevgilerini hissettiğim değerli aileme ve her zaman yanımda hissettiğim canım babama,

Çok teşekkür ederim.

Gönül GÜVEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
GDO	Genetiği Değiştirilmiş Organizma
GD	Genetiği Değiştirilmiş
PCR	Polimerize Zincir Reaksiyonu
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
EC	Avrupa Birliği
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
EPSPS	Enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ENGL	European Network of GMO Laboratories
ERM	European Reference Materials
RSD	Bağıl Standart Sapma
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
C_T	Döngü Eşik Değeri
JRC	Joint Research Center
CRL	Community Referance Laboratory

1. GİRİŞ

Dünya'da belli bölgelerde yetiştirilen genetiği değiştirilmiş tahıl hatları dışında, günümüzde ekilmekte olan pek çok tahıl ürünü, zararlı böceklere direnç sağlamak veya daha önceki yabani hallerinden daha kaliteli ya da farklı ürün üretebilmek için yoğun biçimde ıslah edilerek geliştirilmiştir. İnsanların kullanımı için bitkilerin ilk ıslahından beri süregelen bu tip değişiklikler, aynı türün uzun süreler boyunca iç çaprazlanması yahut aralarında üreme bariyeri bulunmayan yakın türler arası istenen özelliklerin (genlerin) aktarımını veya değiş tokuşunu içerir. Son yıllarda, sadece doğal olarak gen çaprazlaması mümkün olan yakın türlerde değil doğada çaprazlanmaya karşı steril olan türlerde de gen değişimi yapmak mümkün olmuştur. Bu amaçla kullanılan tekniklerden bazıları embriyo-kurtarma metodları, *in vitro – in vivo* embriyo kültürü, yumurta ve yumurtalık kültürleri, *in vitro* tozlaşma ve *in vitro* fertilizasyondur. Buna ek olarak, mutasyonel değişiklikler, örneğin tohumların radyasyona maruz bırakılması gibi yollarla da elde edilebilir.

Geleneksel hibridizasyon ve seçme prosedürlerinin bir takım zorlukları mevcuttur. Bunların başında, ıslahçıların bütün bir genomu transfer ederek çaprazlamak yerine seçilmiş tek özelliği transfer etmek istemesi gelmektedir. Ayrıca genetik olarak sabit çeşitlerin seçilimi ve ayrımı çok yavaş bir işlemdir.

Bu tarz engellerin rekombinant DNA ve transformasyon teknolojileri kullanılarak aşılabileceği görülmektedir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) terimi, genetik materyali doğada çaprazlama veya doğal rekombinasyon yolları dışında değişikliğe uğramış organizmaları tanımlamak için kullanılmaktadır. GDO, kendi başına çoğalıp genetik materyalini transfer edebilen biyolojik bir sistemdir.

GDO, farklı türlerden gen ya da genlerin genetik mühendisliği yöntemleri ile alıcı genomuna kalıcı olarak aktarıldığı ve birçok durumda aktarılan genlerin protein sentezlediği bitkileri ifade eder. Birbiri ile ilişiksiz türler arasında gen aktarımı ve onlardan fonksiyon elde etme işlemi genetik transformasyon olarak tanımlanır.

Avrupa'da deneysel amaçlı salınım bildirimleri incelendiğinde en sık test edilen özelliklerin herbisit toleransı, erkek sterilite/fertilite yenilemesi, Bt-

kaynaklı böcek direnci, virüs direnci, mantar direnci, ve nişasta biyosentezinin değişikliği olduğu görülmektedir (Querchi et al.,2006).

Dünya'da, soya, mısır, patates, şeker pancarı, pirinç, pamuk, kanola ve domates gibi tarım ürünlerinde zararlılara (herbisit ve insektisitlere), hastalıklara ve kuraklığa karşı dayanıklılığını, ürün verimini arttırmak, raf ömrünü uzatmak, bileşimindeki faydalı bir bileşeni arttırmak gibi nedenlerle genetik değişiklikler yapılmaktadır.

Genetiği Değiştirilmiş (GD) soya, GD ekim alanlarının %50'sini kapladığından (73,3 million hektar) dünyada en çok ekimi yapılan GD bitkidir. Bunu %31 ile mısır, %13 ile pamuk ve %5 ile kanola izler. 2013 yılı verilerine göre Dünya'da ekimi yapılan soyanın %79'unun, pamuğun %70'inin, mısırın %32'sinin kanolanın da %24'ünün GDO'lu olduğu belirtilmektedir (ISAAA, 2013).

Dünya'da en çok ekimi yapılan GDO'lu ürünlerin başında gelen soya pek çok gıda maddesinin formulasyonunda yer almaktadır. Soya unu, soya yağı, soya lesitini, soya eti gıdaların yapısına farklı amaçlarla katılan başlıca soya formlarıdır.

GDO'lu ürünlerin tespiti DNA bazlı ya da protein bazlı yöntemlerle yapılmaktadır. Günümüzde GDO tespiti ve miktar analizlerinde kullanılan ve en doğru sonuç veren yöntem Real- Time PCR yöntemidir. Real- Time PCR yönteminde hedef diziye özgü primer ve problar kullanılarak çoğaltılan DNA eş zamanlı olarak oluşan floresan sinyal ile gözlenebilmektedir. Her bir döngüde floresan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir.

Mekanik etkiler, yüksek sıcaklık, pH değişiklikleri, enzimatik aktivite ve fermantasyon gibi aşamaların bir veya birkaçı gıdaların işlenmesinde sıklıkla uygulanan proseslerdir. Bu prosesler DNA'nın degredasyonuna sebep olmaktadır (Gryson, 2010). Bu da DNA bazlı analizlerde gerek DNA izolasyon aşamasında gerekse de PCR amplifikasyonunda zorluk yaratmaktadır. Bu sebeple işlenmiş gıdalarda etkin bir DNA izolasyonu ve kullanılacak analiz metodu PCR amplifikasyonu için son derece önemlidir. Bu iki aşama GDO analizlerinin doğruluğunu, hassasiyetini ve güvenirliğini etkiler.

Bu proje ile işlenmiş soya içeren farklı ürün grupları için en uygun DNA izolasyon yönteminin belirlenmesi ve ürün grupları bazında belirlenen en uygun yöntem ile DNA ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmesi, GDO tarama analizlerinin yapılması, GDO pozitif örneklerde valide edilmiş olan CRL yöntemleriyle ident ve GDO miktar (MON40-3-2, A2704-12 ve MON89788) analizlerinin yapılması hedeflenmektedir.

Projenin 1. aşamasında 20 adet soyalı mantı, bisküvi ve soya unu numunelerinde 3 farklı yöntemle DNA izolasyonlarının yapılması, saflık ve konsantrasyonlarınn belirlenmesi, GDO tarama, ident ve GDO miktar analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Projenin 2. aşamasında kontrollü koşullarda pişirilen roll ekmeklerde 3 farklı sıcaklık ve üç farklı süre uygulamasının, fermantasyonun ve bazı katkı maddelerinin analiz edilen GDO miktarına etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)

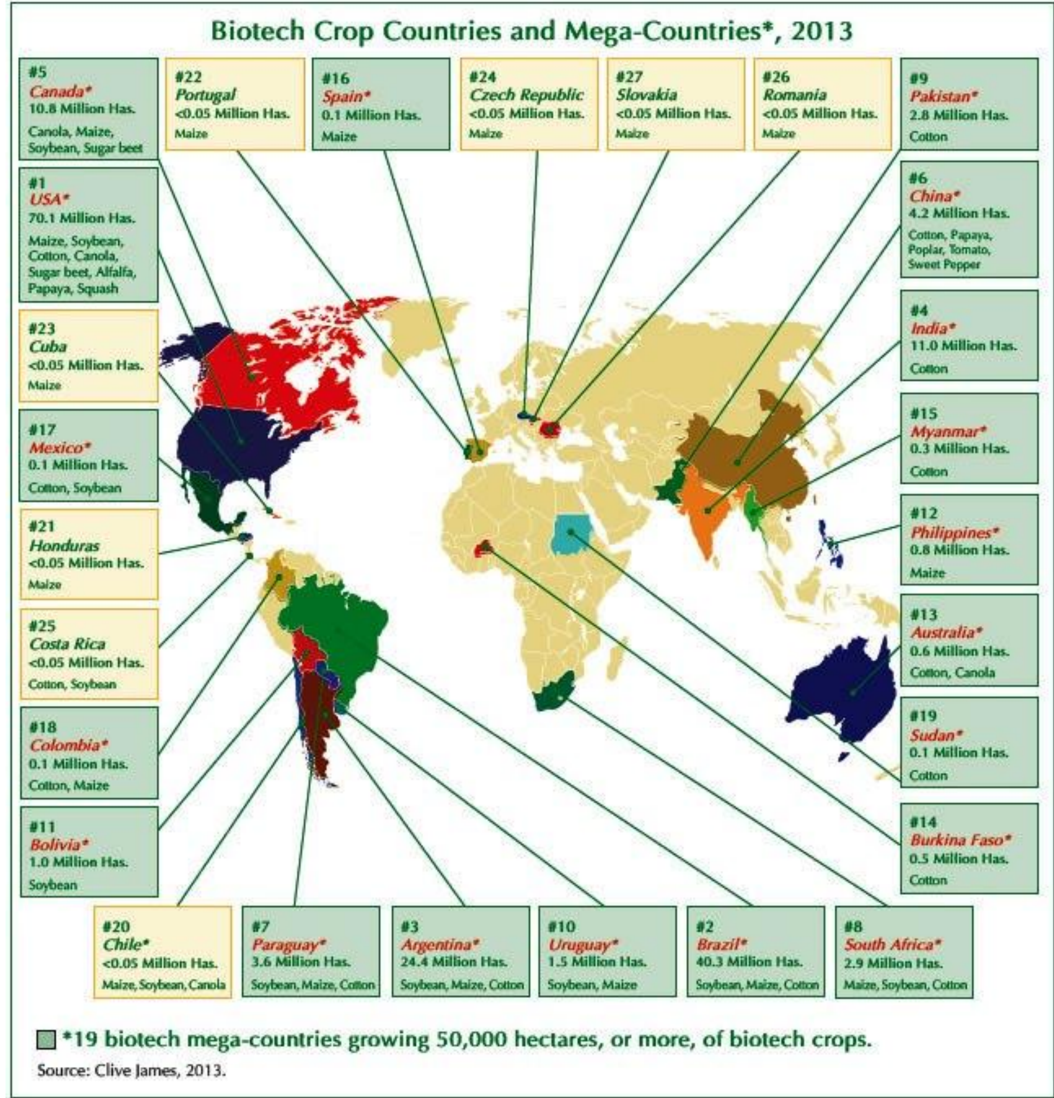
Genetik mühendisliği yöntemleriyle bünyelerine yabancı genler dahil edilerek “genetik yapıları” değişikliğe uğratılan ve bu yabancı genleri genomlarına sabit olarak entegre eden ve bu özellikleri gösteren bitki, hayvan ve mikroorganizmalar, genetik yapısı değiştirilmiş organizma olarak adlandırılmaktadır (Demir ve ark., 2006).

Dünya’da biyoteknolojik mahsüllerin ekim alanları 1996’da 1,7 milyon hektar iken 2013 yılında 175 milyon hektara ulaşarak yakın tarihin en hızlı kabul gören bitki teknolojisi olmuştur. Şekil 2.1’de görüldüğü gibi 2013 yılı itibarı 70,1 milyon hektar ile ABD başta olmak üzere 27 ülkede GD bitki ekimi yapılmaktadır. 2013 yılı verilerine göre Dünya’da ekimi yapılan soyanın %79’unun, pamuğun %70’inin, mısırın %32’sinin kanolanın da %24’ünün GDO’lu olduğu belirtilmektedir (ISAAA, 2013).

Organizmaların moleküler yapı taşlarının (DNA) gen teknolojisi ile değiştirilmesi 1970’lı yılların başında *E. coli* bakterisinin genomlarının klonlanması ile gerçekleşmiştir. Bitkisel üretimde, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak gıda üretimi ilk defa 1960’lı yılların başında gerçekleştirilmiştir. 1967 yılında mevcutlara göre daha yüksek kuru madde ihtiva eden cips amaçlı kullanılabilen patates geliştirilmiştir. Daha sonraki yıllarda mevcuttan daha iyisini elde etmeye yönelik olarak yapılan çalışmalar devam ederek; 1982 yılında rekombinant insülin piyasaya çıkarılmış (Demir ve ark., 2006). Gen transfer edilmiş bitkilerin tarla denemelerine ilk defa 1985 yılında başlanmıştır. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 1994 yılında, genetik mühendisliği ile üretilmiş ilk gıda olan Flavr Savr Domatesine onay vermiştir. Ticari anlamda bitkisel üretim ise 1996 yılında başlanmıştır.

Daha iyi ürünler elde etmeye yönelik çalışmalarda birçok disiplinden yararlanma yoluna gidilmiştir. Nitekim 1902 yılında Japonya’da keşfedilen gram pozitif bir bakteri (*Bacillus thuringiensis*)’nin sahip olduğu bir genin (Bt) biyo-insektisit gibi bazı böceklere karşı doğal olarak dayanıklılık sağladığı belirlenmiştir. Bu gen daha sonra kültür bitkilerine transfer edilerek, kültür bitkilerinin çeşitli böceklere karşı dirençlerinin artırılması hedeflenmiştir. Bu tür uygulamaların insan, hayvan ve hedef dışı fauna üzerinde etkisiz olmalarına

karşın sınırlı kalıcılıkları kullanımlarını kısıtlayan en önemli faktördür. Halen kullanılmakta olan biyo-insektisitlerin % 90'nı Bt genlerinin farklı versiyonlarından oluşmaktadır. Bugün Bt endotoksinleri toplam insektisit pazarının % 5'ini oluşturmaktadır (Öktem, 2001).



Şekil 2.1. Dünya'da GD bitki ekimi yapan ülkeler (ISAAA, 2013)

Bt genlerinde olduğu gibi, bir başka organizmadan (*Streptomyceses S. hyroscopicus*) izole edilen Bar genleri de bitkilerin herbisitlere karşı dayanıklılığını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Nitekim Bar genleri, aktarıldığı bitkiyi bazı herbisitlere karşı dayanıklı hale getirmektedir.

2.1.1 Genetik değişiklik yapılmasının nedenleri

Genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler üzerine yapılan çalışmalardaki amaç bitkileri hastalık ve zararlılara dirençli, tarımsal üretim maliyetlerini azaltarak, elde edilecek ürünün görünüşünü, besin değerini, işleme veya muhafazaya ilişkin özelliklerini iyileştirmek suretiyle ürün kalitesini yükseltmektir.

Binlerce yıldan beri insanlar bitkilerin genetik özelliklerini ıslah ile değiştirmişlerdir. Takip edilen bu yol oldukça başarılı olmuştur. Ancak bu yol, eşeysel uyumlu ve yakın akraba bitkilerin melezlenmesi esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla bir süre öncesine kadar, farklı türler arasında özelliklerin aktarılması mümkün olmamıştır. Gen teknolojisi bu engeli ortadan kaldırmış ve araştırıcılara bitki genlerinde belirlenmiş değişiklikleri yapabilme fırsatı vermiştir. Araştırıcılar da bu fırsatı; artan dünya nüfusunu beslemek ve giydirmek için kültür bitkilerinin verimini ve kullanılabilirliğini artırmak yönünde kullanmaya çalışmışlardır (Demir ve ark., 2006)

2.1.1.1 Zararlılara dayanıklılık

Böcekler, bir taraftan bitki dokularını yiyerek bitkilere mekanik zarar vermekte, diğer taraftan virüs, mantar ve bakteri gibi hastalık etmenlerinin bulaşmasına sebep olmaktadır. Böceklere dayanıklı bitkilerin elde edilmesinde, zararlı böceklere karşı kullanılan toksinler ve etki mekanizmaları kullanılmaktadır. *Bacillus thuringiensis*, belli böcekler için toksik olan, fakat diğer hayvanlar ve insanlara zarar vermeyen bir madde oluşturmaktadır. Bu özelliğinden yararlanarak farklı bitki türlerinde zararlı böceklere karşı dayanıklılık oluşturulabilmiştir (Çizelge 2.1). Bütün böcekler için toksik olmayan Bt toksinlerine alternatif proteaz inhibitörlerinin aktarılmasında yatmaktadır. Bunlar arasında *Vigna. sinensis*'e ait bir tripsin inhibitör protein geni, patates ve domatesten yara ile oluşan proteaz inhibitör aileleri olan OI-I ve PI-II ve belli Serin-Proteinaz inhibitörleridir. Antimetabolitik enzimler, örneğin böceklerin önemli sindirim enzimlerini engelleyerek normal böcek fizyolojisini etkilemektedirler (Demir ve ark., 2006). Diğer başka insektisit dayanıklılık geni olarak Streptomyces türlerinden bir Kolesterol-Oksidaz geni ve bezelyeden bir lektin geni izole edilebilmiştir. Lektinler böcek bağırsağında besin bileşiklerini bağlamakta ve normal sindirimi bozmaktadırlar. Böylece bu tip bir proteini içeren bitkiler böcek zararından korunmaktadırlar. Bu genlerin aktarılması ve transgenik bitkilerde çoklu dayanıklılık sisteminin geliştirilmesi ile zararlı böcek

populasyonlarında dayanıklılığın hızlı bir şekilde gelişmesi engellenmek veya uzatılmak istenmektedir (Demir ve ark., 2006).

Çizelge 2.1. Zararlılara ve hastalıklara dayanıklı transgenik bitkiler (Demir ve ark., 2006)

Transgenik Bitki	**Özellik**	**Genteknolojik Değişiklik**
Mısır	Mısır kurdu	CrylA (b) geninin *Bacillus thuringiensis* ‘den aktarılması, PEPC promötörü
Pamuk, domates	pamuk kurdu, pembe kurt, yeşil kurt ve domates meyve kurdu	CrylA (b) geninin *Bacillus thuringiensis* ‘den aktarılması
Patates	Patates Böceği	
Patates	Yaprak kıvırcıklık virüsü Patates virüsü (PVY)	Yaprak kıvırcıklık virüsünün ORF-1 ve ORF-2 bölgelerindeki DNA-kısımlarının ve PVY için kabuk proteinlerinin aktarılması
Şekerpancarı Buğday Çeltik	Rhizomania virüsü, nekrotik sarı damar hastalığı (BNYV virüsü) Sarı cücelik virüsü (BYD virüsü), Çeltik şerit virüsü, cücelik virüsü, FMV	Virüsün belli kabuk veya taşıyıcı proteinini kodlayan genlerin aktarılması
Patates	Mildiyö	*Aspergillus niger*’den Glikoz-Oksidaz genin aktarılması, 35-S promötörü
Buğday	*Fusarium* spp., *Septoria*	Bilinmiyor
Çeltik	*Rhizoctonia solani*	Chitinaz gni Chi11’in aktarılması
Patates	Yumuşak çürüklük	Pektatlyaz genlerinin aktarılması
Çeltik	Çeltikte bakteriyel leke	Xa21 geninin aktarılması

2.1.1.2 Hastalıklara dayanıklılık

Bitkiler patojen enfeksiyonunu sınırlamak için farklı teşvik edilebilen savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bunlar arasında hücre duvarlarının ligninleşmesi, küçük antibiyotik moleküllerin üretilmesi, yaralanmış bölgedeki konukçu hücrelerin ölmesi ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi sayılabilir. Virüsler, bakteriler, mantarlar ve nematotlara karşı sistematik olarak edinilen dayanıklılık birçok sayıdaki dayanıklılık geninin beraber hareket etmesiyle ortaya çıkmaktadır (Melchers and Stuiver, 2000). Virüsler, mantarlar ve bakteriler özellikle meyveler ve sebzelerde büyük zararlar yaparlar. Virüsler, bir bitkiden diğer bitkiye bulaşmak için böcek gibi aracılara ihtiyaç duyduğundan bunlara karşı genel olarak dolaylı yollarla mücadele yapılmaktadır. Mantar ve bakterilerin bitkilere bulaşması olayında konukçu-patojen ilişkisinin ön plana çıkması nedeniyle dayanıklılığın gen teknolojisi kullanılarak aktarılması, böcek ve virüslere göre daha az başarılı olmuştur (Demir ve ark., 2006).

2.1.1.3 Herbisitlere dayanıklılık

Tarımsal alanlarda yabancı otlar nedeniyle verimde oluşan kayıp dünya çapında % 10-15 olarak tahmin edilmektedir. Geniş alanlarda yapılan tarımda bu nedenle genelde yabancı ot kontrolü için herbisitler kullanılmaktadır. Seçici olarak etki eden herbisitler (Bromoksinil, Sulfonilharnstof), belli morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip yabancı otları öldürmektedirler. Bazı seçici herbisitler uzun süre toprakta kalabildiklerinden taban suyuna karışmakta ve dayanıklı yabancı otların ortaya çıkması tehlikesini doğurmaktadır. Total herbisitler ise toprakta çabucak çözünmektedirler. Fakat bunlar hem yabancı otlar hem de kültür bitkileri için aynı derecede toksiktirler. Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler, herbisitlerdeki etkin maddeyi inaktif hale getiren ve herbisitin hücum ettiği alanı zarar meydana getirmeyecek şekilde değiştiren proteinleri kodlayan dayanıklılık genlerine sahiptirler. Bu dayanıklılık genleri ya mikroorganizmalar ya da doğal olarak dayanıklı bitkilerden izole edilmektedir. Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler ve dayanıklılık mekanizmaları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Herbisitlere dayanıklı transgenik bitkiler (Demir ve ark., 2006)

Transgenik Bitki	Herbisit	Dayanıklılığın Etki Mekanizması
Tütün, mısır, pamuk, kolza, soya, şeker pancarı, domates	Glifosfat	EPSP-Synthase enzimi için 35S-promotörü tarafından yönlendirilen genin ve Oksidoreduktaz için bir bakteriyel genin aktarılması herbisitin neden olduğu yoğun EPSP-Synthase üretimi ve aynı zamanda Oxidoreduktaz ile herbisitin detoksifikasyonu ile dayanıklılık ortaya çıkmaktadır
Patates, tütün, mısır, yonca, kavun, kenevir, kavak,çeltik, soya, şekerpancarı, domates, kolza, buğday	Fosfonitrisin	Bar geninin *S. hygroscopicus*'den transfer edilmesiyle herbisidin asetilasyon ile detoksifikasyonu sağlanmaktadır.
Patates, tütün, pamuk, domates	Bromoksinil	*Klebsiella ozaenae*'den bxn geninin aktarılması herbisitin detoksifikasyonunu sağlamaktadır
Patates, tütün, pamuk	2,4.D	*Alcaligenes eutrophus*'den 2,4.D-Monooksigenaz geninin transferi herbisidin detoksifikasyınunu sağlamaktadır
Tütün	Atrazin	Dayanıklı bir yabani formdan psb-A geninin veya bir Gltathion-S- Transferaz geninin aktarılması herbisidin daha az etkili olmasını veya detoksifikasyınunu sağlamaktadır
Patates, tütün, pamuk, kenevir, kiwi, mısır, soya, şekerpancarı, domates	Sülfonil Üre Maddeleri	*N. tabacum* veya *A. thaliana*'dan değiştirilmiş ALS genlerinin aktarılması herbisidin hedef enzimin olan ALS' ye olan afinitesini azaltmaktadır

2.1.1.4 Strese dayanıklılık

Çevreden kaynaklanan strese maruz kalan bitkiler kendilerini korumak için stratejiler geliştirirler. Sıcaklık, soğuk, su eksikliği, yüksek tuzluluk veya ağır metallere karşı yüksek toleransın bitkilere aktarılması bunların marjinal alanlarda yetiştirilmesini mümkün kılacaktır. Gen teknolojisi kullanılarak ekstrem koşullara toleranslı bitkileri geliştirmek henüz başlangıç safhasındadır. Strese karşı daha yüksek bir tolerans, antioksidantların oluşumunu sağlayan enzimleri kodlayan genlerin aktive edilmesiyle sağlanmaktadır. *Nicotiana tabacum*'a Mangan- SOD geninin aktarılması ile ozon zararı 3-4 kat azaltılabilmiştir. Bitkilerin sıcaklık, tuzluluk veya soğuk stresi altında su düzeyinin dengede tutulmasında osmolitik maddeler büyük öneme sahiptir. Osmolitik maddeler, suyu bağlayabilmekte ve proteinlerin yapılarının korunmasında su moleküllerinin yerini alabilmektedirler. Osmolitik maddeler çoğunlukla şeker ve amino asit döngüsünden oluşan düşük moleküler bileşiklerdir. Mannito-Hidrogenaz oluşumu için bir genin bitkiye aktarılmasıyla bir şeker alkolü olan mannitol birikmekte ve bu birçok bitkide kurağa karşı dayanıklılığı ortaya çıkarmaktadır (Anon., 2001; Demir ve ark., 2006). Soğuğa karşı toleransı artırmak için kloroplast membranlarının lipitler ile doyurulmasına katkıda bulunan genler uygundur. Kloroplastların, tilakoid membranının oluşturulmasıyla ilgili yağ asitleri ne kadar fazla doymuşluk derecesine sahip ise soğuğa karşı hassasiyet ve buna bağlı olarak fotosentezin durdurulması azalmaktadır. Kabaktan, tütüne Gliserol-3- fosfat-Asiltransferaz oluşumu için cDNA'nın aktarılması buna örnek olarak verilebilir. Model bitki *Arabidopsis thaliana*'da soğuğa karşı korunmada genlerin harekete geçirilmesinde anahtar rol oynama ihtimali olan bir düzenleyici gen (CBF1) izole edilmiştir (Demir ve ark., 2006). Tuza karşı dayanıklılığın artırılması için farklı stratejiler mevcuttur. Transgenik çeltikte örneğin Glutamin-Sintataz enziminin fazla ürettirilmesi ile tuza karşı tolerans arttırılmıştır (Hoshida et al., 2000). *Athrobacter globiformis*'den Arabidopsis'e Cholinoxigenaz geninin aktarılması bitkilerde Glisinbetainlerin birikimine ve böylece tuza karşı dayanıklılığın artmasına sebep olmuştur.

Bitkilerde ağır metallere karşı toleransı artıran genlerin aktarılması ile sadece kirlenmiş topraklarda bitkilerin iyi yetişmesi sağlanmaz. Aynı zamanda aşırı kirlenmiş toprakların iyileştirilmesi de sağlanmış olur. Bitkilere özel zehirlenmeyi ortadan kaldırma mekanizması ağır metallerin fitojelatinlere (örneğin organik asitlere) bağlanması ve bunların hücrelerin vakuollerinde biriktirilmesidir. Methalotionein genlerinin tütüne aktarılmasıyla bu bitkide

Kadmiyuma karşı tolerans artırılmıştır. *Liriodendron tulipifera*'ya civaya karşı dayanıklı bir bakteriden civa redüktaz geninin aktarılması ile toksik civa konsantrasyonlarına karşı tolerans elde edilmiştir (Demir ve ark., 2006).

2.1.1.5 Verim

Bitkilerde verimin oluşmasında fotosentez, solunum ve azot fiksasyonu önemli rol oynar. Fakat bu mekanizmalar oldukça karmaşık olup moleküler temelleri henüz tam anlaşılamamıştır. Örneğin "azot fiksasyonu" özelliğinin bitkilere aktarılabilmesi için bakterilerinden bitkilere anahtar enzim olan Nitrogen gazı kodlayan bir çok yapısal protein (nifH, D,K) geni aktarılmalı ve bunların etki şekli koordine edilmelidir. Bakterilerde nodülasyon faktörlerinin etki alanının değiştirilmesi ile önemli kültür bitkilerinde nodülasyon sağlanmıştır. *Chlorella sorokiniana* alg'inden izole edilen ve bitkilere aktarılan bir gen, azotu değerlendirme oranını artırmaktadır (Woods, 1999). Çeltikte belli proteinlerin oluşumunu engelleyen ve dane olum dönemini uzatan bir geninin aktarılması ile verim artırılmıştır (Finkel, 1999; Demir ve ark., 2006).

2.1.1.6 Kimyasal içerik

Besin maddelerinin kalitesini değiştirmede kullanılan yöntemlerdeki amaç içerik maddelerini beslenme fizyolojisi açısından veya gıda fizyolojisi açısından daha uygun formlara dönüştürmek veya bitkilerde bulunmayan ya da az bulunanlara aktarmak veya zenginleştirmektir. Bu konuda yapılan bazı çalışmalar Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Bitkilerdeki şeker ve nişasta metabolizmasının değiştirilmesinde, sadece bir nişasta formu (amiloz veya amilopektin) üzerinde durulmaktadır. Bu da nişastanın gıda ve kimya sanayinde kullanımını kolaylaştırmaktadır. Bakteriyel bir genin aktarılması ile patateste siklodekstrin üretilebilmektedir. Siklodekstrin gıda ve eczacılık sanayinde uçucu maddelerin veya aromatik bileşiklerin stabilize edilmesinde veya istenilmeyen maddelerin (acılık, kolesterin) uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde insan sağlığı açısından önemli olan vitaminler, mineral maddeler ve iz elementleri yeterince alınamamaktadır. Örneğin dünya nüfusunu besleyen bitkilerin başında gelen çeltik, çok az miktarda A vitamini içermektedir. Ayrıca tahılda bulunan Fitat nedeniyle demirin kullanımı etkilenmektedir. Bu nedenle ß-karoten üreten ve daha

fazla demir biriktiren ve kullanılabilirliğine sahip çeltik geliştirmek amaç olmuştur. Sonuçta Golden Rice adında bir çeltik elde edilmiştir (Ye et al., 2000).

Değiştirilmiş yağ asidi kompozisyonuna sahip bitkiler ticari olarak satılmaktadır. Beslenme fizyolojisine veya endüstriye uygunluk bakımından örneğin C10 ila C22 atomlarını içeren yağ asitlerine sahip kolza çeşitleri geliştirilmiştir (Demir ve ark., 2006). Yağ asitleri kompozisyonların değiştirilmesinde, geriye dönüş sebebiyle istenmeyen sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Yağ asitleri metabolizması ile ilgili belirlenen enzimler yanında serbest ve membrana bağlı olan yağ asitlerinin değişimini sınırlayan mekanizmalar vardır.

Bitkilerdeki protein kompozisyonunun değiştirilmesinde hedef, amino asitlerdir. Özellikle lisin birçok gıda maddesinde ve yem bitkisinde yeterli miktarda bulunmamaktadır. Birçok araştırmada hedef lisin biyosentezinde rol oynayan bir enzimi bitkilere aktararak tanedeki lisin oranının arttırılmasıdır (Demir ve ark., 2006).

Çizelge 2.3. Bitkilerde gen transferi ile ürün kalitesinde meydana getirilen değişiklikler

Bitki	**Kimyasal İçerik Maddesi**	**Kullanılan Genlerin Kaynağı**
Kolza, Soya fasulyesi, mısır	Lisin, Methionin, Triptofan gibi amino asitlerin miktarının artırılması	Lisin ve Triptofanını üretimini artıran bakteriyel kökenli genler
Patates, Cassava	Toplam Protein Miktarının Artırılması	Alerjik etkiye sahip olmayan bir Albümin geninin aktarılması, tohumlardaki ekspresyonu
Kolza	Yağ asidi zincirlerinin kısaltılması, Laurin asit oranının artırılması	*Umbellularia californica*'dan Asetil-ACP-Tioesteraz spesifik genin aktarılması
Soya fasulyesi, kolza, ayçiçeği	Yağ asidi içeriğinin değiştirilmesi, doymamış yağ asitlerinin artırılması	*FAD* 3 ve *FAD* 2 geninin klonlanması.
Patates	Amilaz veya amilopektin içermeyen nişasta veya sakaroz birikimi	Bitkilere özel enzimlerin (örn. GBSS, Q enzimi, AGPaz) kazandırılması
Patates	Siklodekstrin ekspresyonu	*Klebsiella pneunmoniae*'den CTG geninin aktarılması
Patates	Nişasta oranın artırılması	Mutasyona uğrayan AGPaz geninin *E. oli*'den aktarılması
Çeltik	ß karotenin üretilmesi	Narcissuus türleri veya *E. uredovora*'dan Terpenoid metabolizmasının anahtar enzimlerini kodlayan genlerin aktarılması
Çeltik	Demir içeriğinin artırılması ve kullanılabilirliğinin Azaltılması	*Phaseolus vulgaris*'ten bir demir geninin aktarılması, *A. fumigatus*'tan bir Phytase geninin aktarılması
Domates	Lycopin ve Lutein Gibi karatinoidlerin oranının artırılması	Phytoenin, lycopine dönüştürülmesi için bir bakteriyel genin aktarılması

2.1.1.7 Olgunlaşma

İlk yapılan transgenik değişikliklerin amacı ürünlerin dayanıklılık ve depolama süresini ve de tadını değiştirmek amacıyla olgunlaşma süresi üzerinde yoğunlaşmıştır. Olgunlaşma süresinin geciktirilmesi ile ilgili başlangıç noktası bitkilerdeki etilen oranının düşürülmesidir. Bu da doğal enzim proteininin oluşumunu engelleyen domates kökenli Aminosiklopropan-Karboksilat-Syntaz27 (ACC) geni ile başarılmıştır. Alternatif olarak ACC-Deaminaz enzimi oluşumu için bitkilere bakteriyel bir gen aktarılabilir ki bu etilen oluşturan enzim ile ACC maddesi için rekabete girer ve ACC'yi α-Ketobytrata dönüştürür.

Olgunlaşma süresi ile ilgili diğer bir yol Polygalaktorunaz enziminin engellenmesidir. Bu enzim Pektinin ana unsuru olan Polygalakturonik asidi parçalamakta ve bu sayede meyvelerin yumuşaması gecikmektedir. Polygalakturonaz oluşumunu kontrol eden bir geninin domatese aktarılması ile ABD'de ilk kez gen teknolojisi kullanılarak değiştirilen bir gıda ürünü Flavr Savr R domatesi tescil edilmiştir (Demir ve ark., 2006).

2.1.1.8 Toksik ve alerjik maddeler

Bitkilere, kaliteyi etkilemesi yanında içerik maddelerinin hazmını veya kullanılabilirliğini sınırlayan, toksik etki gösteren veya bazı insanlarda tüketildiğinde alerjik reaksiyonlara sebep olan bir dizi madde bulunmaktadır. Gen teknolojisi kullanılarak bu tip maddelerin oranının azaltılması veya daha az toksik veya alerjik etki yapan formlara dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Zehirli maddeler arasında tahıllar ve sebzelerde bulunan demir gibi önemli mineral maddelerin alımını engelleyen fitik asit bileşikleri (Fitat) vardır. Fitaz enziminin ilave edilmesiyle tohumdaki fitin asit oranı çeltikte olduğu gibi azaltılabilmektedir. Glikoalkaloidler patates ve domateste bulunan toksik maddelerdir. Patateste Glikolalkaloidi Alpha-Chaconin bakımından anahtar enzim olan UDP-Glukoz-Glucosiltransferazın etkisi bir genin aktarılması ile durdurulabilmiştir (Anon., 2001). Bilinen allerjenlerin birçoğu protein yapısında olup, tahıllardaki Gluten28, soya, yer fıstığı ve cevizden elde edilen proteinlerdir. Antisens RNA teknolojisi sayesinde çeltikte alerjik etki yapan proteinin oranı azaltılabilmiştir (Demir ve ark., 2006).

2.1.1.9 Yenilenebilir ürünler

Gen teknolojisinin diğer bir kullanım alanı da endüstriyel proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve yenilebilir sentetik maddelerin üretilmesidir. Transgenik bitkiler yüksek aktivite gösteren protein ve kompleks bileşiklerini üretmek için uygun organizmalardır. Transgenik bitkilerden protein üretimi ile ilgili çalışmalar çok yönlü olup, gıda maddesi sanayinde enzimlerin kullanılması yanında eczacılıkta etkili olan çok sayıda etken maddeyi de kapsamaktadır. Bitkisel ve organik yağlar önemli endüstriyel hammaddelerdir. Bitkisel yağlar, fosil yakıtlara kıyasla yüksek olan maliyetleri nedeniyle endüstriyel kullanım için ikinci derecede öneme sahiptirler. Endüstriyel yağlarda aranan özellikler dikkate alınarak istenilen yağ asidi kompozisyonuna sahip kolza çeşitleri geliştirilmiştir (Çizelge 2.4). Bitkilerde karbonhidrat üretimi, nişasta sanayinde yıllardan beri kullanılan bir tekniktir. Endüstri bakımından yapıştırıcı ya da folya yapımında kullanılan değiştirilmiş nişasta, kağıt ürünleri üretiminde hammadde olarak kullanılan selüloz, jel ve kabartıcı olarak kullanılan pektinler öneme sahiptirler (Çizelge 2.4). Bugüne kadar endüstriyel olarak elde edilen nişastanın % 80'ni kimyasal veya fiziksel işlemlere tabi tutulmaktadır. Karbonhidrat metabolizmasında yapılacak değişiklikler, bu oranı belirgin derecede düşürebilir (Demir ve ark., 2006).

Birçok bakteri alifatik polyester (PHB) üretiminde kullanılmaktadır. Toksik olmayan bu tür ürünlere şekil verilebilir. Ayrıca bu tür ürünler biyolojik olarak da ayrıştırılabilir. Bu özelliğinden dolayı bu ürünler kısaca "Biyoplastik" olarak adlandırılırlar. Bitkilerde bu tür ürünlerin üretimini kodlayan üç gen (phbA, phbB, phbC), *R. eutropha* adlı bakteriden izole edilmiş ve *Arabidopsis thaliana*'ya aktarılmıştır. Bakteriyel fermentasyon sonucu elde edilen ve BiotopolTM adı altında piyasaya sürülen Polihidroksibütrat Ko-Polimeri (PHB/V), PHB'ye göre endüstriyel kullanım açısından daha uygun özelliklere sahiptir.

Çizelge 2.4. Endüstriyel amaçlarla bitkilerde gen teknolojisi kullanılarak yapılan değişiklikler

Bitkiler	**İçerik Maddesi**	**Kullanılan Genlerin Kaynağı**	**Kullanım Alanı**
Tütün, yonca	α-amilaz, Fitaz, Xylanaz gibi enzimlerin ekspresyonu	*B. lichniformis* (α-amilaz), *A. niger* (Fitaz), *C. Thermocellum* (Xylanaz) Genleri	Gıda sanayi
Kolza	Yağ asitlerinin doymamış hale getirilmesi	Bitkiye has genlerin veya petroselinik asitin ekspresyonu için Umbelliferalardan genlerin antisens represyonu	Polimer üretimi, deterjan
Kolza	Yağ asidi zincirlerinin Uzatılması	*L. douglasi*i'den LPAAT geninin Aktarılması (erusik asit oranının artırılması)	Çözücü maddeler, yumuşatıcılar vs.
Kolza	Yağ asidi içeriğinin değiştirilmesi (Laurik asit oranının artırılması)	*U. californic*a'dan bir özel Acety-ACP-Tioestraz için gen aktarımı	Temizlik maddesi
Patates	Amiloz veya amilopektin içermeyen nişasta veya sakkaroz birikimi	Bitkilerin kendi enzimlerinin (GBSS, Q enzimi, ABPase) Antisens-Represyonu	Yapıştırıcı, kağıt (amilopektin), folyo (amiloz)
Patates	Fruktan	*K.pneunmoniae*'den CTG geninin aktarılması	
A.thaliana, kolza, soya	PHB üretimi	*R. eutropha*'dan 3-Ketotiyolaz, Aseto-asetil-CoA Reduktaz, PHA-Syntaz enzimleri için gen aktarımı	Biyolojik olarak ayrışabilen polimer
A. thaliana, Kolza	PHB/V üretimi	*E. coli* ve *R. Eutropha*'dan 4 genin (ilvA466, BktB, phbB, phbC) aktarılması	Biyolojik olarak ayrışabilen polimer

2.1.1.10 Sekonder metabolitlerin üretimi

Bitkiler ana içerik maddeleri (karbonhidratlar, proteinler ve lipitler) yanında sekonder içerik maddelerine de sahiptirler. Bu tür içerik maddeleri sekonder metabolit olarak adlandırılmaktadır. Farmakolojik etkilerinden dolayı bazı sekonder metabolitler bitkisel ilaçlarda hammadde olarak kullanılmaktadır. Sekonder metabolitler kısmen sentetik olarak elde edilemezler ve bitkilerden ekstrakte edilmeleri gerekmektedir. Biyosentez yollarının anlaşılması ve önemli genlerin tespiti ile sekonder metabolitleri değiştirme ve onların bitkideki oranlarını artırma mümkün hale gelmiştir.

Gen teknolojisi sayesinde ilaçların etken maddelerinin teşhis ve tedavi amacıyla kullanımı mümkün olabilmiştir. Örneğin serum ve aşılar bitkilerde üretilebilmiştir. Bu ürünler tıpta (teşhis, tedavide, yenebilir aşı maddeleri), kimya ve ilaç endüstrisi (katalitik antikor, biyosensörler) ile tarımda (hastalık ve zararlılara dayanıklılık, gıda ve yem kalitesinin artırılması) kullanılmaktadır. Aşılar, hem pasif hem de aktif bağışıklık kazandırmaya uygun olup, organ nakli sonrası tedavide de kullanılabilmektedirler. Bugüne kadar geleneksel yolla yeterli miktarda üretilemeyen ilaç ham maddelerinin bitkiler vasıtasıyla üretimi, bir alternatif yöntem olarak kullanılmaktadır. Kompleks proteinlerin sentetik olarak

üretilmesi zor olmasına karşılık bitkiler vasıtasıyla proteinlerin üretilmesi daha kolaydır. Transgenik bitkilerden elde edilen proteinlerin depolanma özelliği, diğerlerine göre daha yüksektir. Geleneksel yolla yetiştirilen patates yumrusunda, normal depolama koşullarında iki yılda en az % 50 kadar aktivite kaybı tespit edilmiştir.

Transgenik bitkilerde üretilen aşılar, hayvansal sistemlerdeki üretime göre patojenlerle (örneğin AIDS veya Hepatit virüsleri, BSE ve toksinler) bulaşma tehlikesi daha azdır. Ayrıca ağızdan uygulanabilen aşıların üretim maliyeti daha düşüktür. Zira aşılar bitki besinleri ile beraber alınabilmekte ve maddelerin izolasyonu ve temizlenmesine gerek kalmamaktadır. Ayrıca diğer bir avantajı da farmakolojik maddelerin doğrudan mevcut tarımsal üretim sürecine entegre edilebilmesidir (Demir ve ark., 2006).

Bitkisel ürünlerin izole edilmesi ve işlenmesinde kullanılan teknikler oldukça gelişmiştir. Örneğin patates endüstrisinde ve biracılıkta bu yönde çeşitli deneyimler mevcut olup, bu yolla ürünler en saf haliyle elde edilebilmektedir. Proteinlerin temizlenmesinin gerektiği durumlarda ticari kullanımda toplam % 1 oranında çözülebilir protein bulunması gerekmektedir. Transgenik bitkilerde ticari olarak üretilen ilk protein tavuktaki viridin proteini olup, bu transgenik mısır bitkisinde üretilmekte ve teşhis amacıyla kullanılmaktadır. Transgenik bitkilerde üretilen ilaç etken maddelerin üretimi ile ilgili bazı örnekler Çizelge 2.5'de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Transgenik bitkilerde ilaç etken maddelerinin üretilmesine ilişkin örnekler

Ürün	Kullanım	Oranı	Aracı Bitki
İnsan serum albumini	Kan proteini	% 0,02 GLP[1]	Patates, tütün
İnsan hemoglobini α,β	Kan yedek maddesi, acil durum ilacı	% 0,05 tohum	Tütün
İnsan α-1-antitripsini	Cistik fibroz, Karaciğer hastalıkları	Bilinmiyor	Çeltik
İnsan enkafalini	Acıların Tedavisinde Nörotransmitterler	% 0,10 tohum	Arabidopsis
İnsan hirudini	Trombin engellenmesi	% 0,3 tohum	Kanola
İnsan somatotropini	Cücelik, Tuner sendromu	% 7 GLP[1]	Tütün
Glukoserebrosidaz	Glukoserebrosid lipidozudur	%1,0-10,00 GLP	Tütün
pEGF	Domuzda epidermal Büyüme faktörü (pEGF)	% 0,12 GLP	Tütün
İnsan Laktoferrini	Demir miktarının artırlması	% 0,10 GLP	Patates, domates, çeltik
Kolera Toksin B	Kolera (*V. cholerae*)	% 0,30 GLP	Patates (Agrobacterium)
Hepatit B–yüzey Antijeni	Hepatit B (Hepatit B virüsü)	<%0,01 FG[2]	Tütün, patates, acı bakla (Agrobacterium)
Norwalk virüsü Kapsid proteini	Diarrhöe (Norwalk virüsü)	% 0,37 GLP % 0,23 GLP	Patates Tütün (Agrobacterium)
Glikoprotein	Kuduz (Rabies virüsü)	% 1,00 GLP	Domates, tütün, ıspanak (TMV, AIMV)

Çizelge 2.5.devamı

Ürün	Kullanım	Oranı	Aracı Bitki
Glikoprotein B	Zitomegalie hastalığı	<% 0,02 GLP	Tütün (Agrobacterium)
VP 1 FMDV	Deli dana hastalığı (FMD virüsü)	Bilinmiyor	Yonca,Arabidopsis (Agrobacterium)
Glikoprotein S	Domuz yavrusunda Diarrhöe	<%0,01 FG % 0,20 GLP	Mısır (Agrobacterium), tütün
VP 60 HDV	Tavşanlarda Hemarrhagik ateş (HDV)	% 0,30 GLP	Patates (Agrobacterium)
Guyın 13 MAK'sı, sekrete edilmiş	Diş çürüklüğü (Streptococcus mutans)	500 µg/g FG yaprakta	Tütün (Agrobacterium)
	Herpex simplex (Herpex simplex virüs 1 ve 2)	Bilinmiyor	Mısır, soya
Kimerik antibodyler	Kanser tedavisi (karzinoembriyogenik antigen)	Bilinmiyor	Çeltik
İnsan scFV' si	Kanser tedavisi (karzinoembriyogenik antigen)	30 µg/g FG	Çeltik, buğday

[1] GLP = toplam çözünebilir protein; [2] FG = Taze ağırlık

2.1.2 Genetik değişiklik yöntemleri

Başarılı bir transgenik bitki jenerasyonu için; bitkinin rejenerasyonu için başarılı yöntemler, DNA aktarma metotları, transgenik hücre seçimi ve fertil fenotiplerin oluşumu gereklidir (Hansen and Wright, 1999). Yabancı DNA'yı bitkinin genomuna aktarmanın başlıca üç yöntemi:

1.Agrobakterium aracılığı ile gen transferi

2. Protoplast temelli gen transferi

- Kimyasal temelli (PEG)
- Elektroporasyon
- Mikroenjeksiyon
- Lipozom aracılığı ile

3.Biyolistik gen transferi

2.1.2.1 *Agrobacterium* aracılığı ile gen transferi

Bitki transformasyonu konusunda pek çok farklı yaklaşım olmakla birlikte, bitkilerde genetik modifikasyon sağlamak için kullanılan bir kaç temel yöntem vardır. Bu teknolojilerden en eskisi, 1980'lerde geliştirilmiş olup ilgilenilen genin alıcı bitkiye aktarılmasında bir bakteri türünü (*Agrobacterium tumefaciens*) kullanmaktadır.

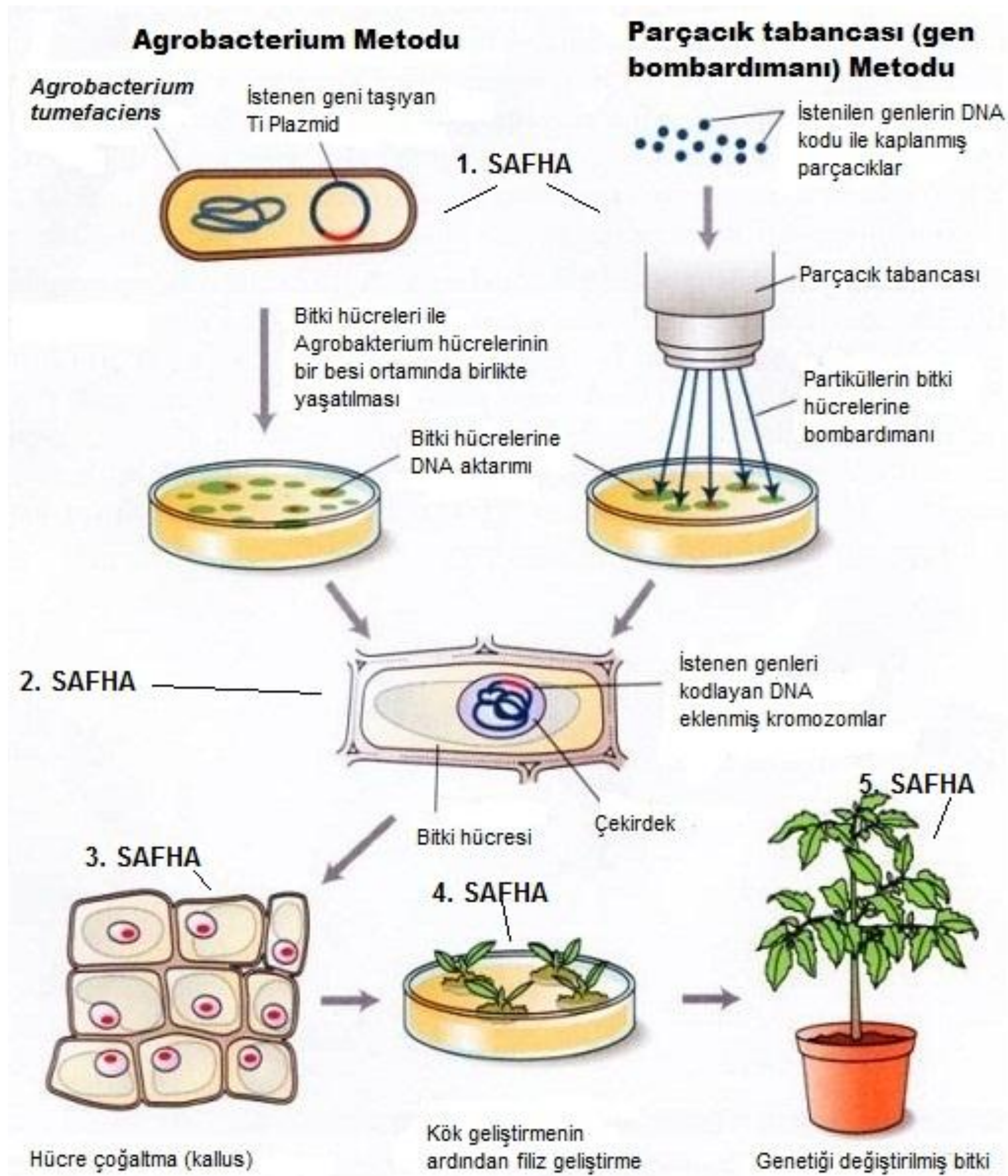
Agrobakter, 20. yüzyıl başlarından beri bilinen ve bitkilerde crown gall hastalığına sebep olan bir mikro organizmadır. Doğada *Agrobacterium tumefaciens*, tümör oluşumuna sebep olan (Ti) plazmidinden belirli bir DNA parçasını (T-DNA) enfekte olan hücrenin çekirdeğine aktararak alıcı genomuna kalıcı olarak entegre olup eşlenmesi ile tümör oluşturma yeteneğine sahiptir. Aktarılan bu T-DNA parçasının her iki yanında transfer için cis element sinyali olarak görev yapan 25 baz dizilik (bp) tekrarlar yer alır.

Bilim adamları, T-DNA sınırları arasına yerleştirilmiş herhangi bir yabancı DNA'nın bitki hücrelerine transfer edilebilmesi avantajını kullanarak, normalde yer alan hastalığa sebep olan genleri, aktarımı istenen özel DNA dizisi ile değiştirerek modifiye eden Agrobakter suşları geliştirmişlerdir.

Bitki biliminin gelişimiyle birlikte, Agrobakter yoluyla bitki hücrelerine gen transferinin anlaşılması hakkında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Ancak doğada Agrobakter yalnızca çift çenekli bitkileri enfekte etmektedir. Bu nedenle tahılları (tek çenekli) da içine alan ekonomik önemi olan bitki uzun süre genetik manipülasyona ile erişilmez olarak kalmıştır. Bunun için, polietilen glikol-yoluyla transfer, mikroenjeksiyon, protoplast ve sağlam hücre elektroporasyonu ve gen silahı (gen bombardımanı) teknolojisi gibi alternatif direkt transfer metotları geliştirilmiştir (Querchi et al., 2006).

Ancak Agrobakter yoluyla gen transferinin direk gen transferi yöntemlerine göre önemli avantajları vardır. Transgenin kopya sayısını azaltarak transgenin ko-supresyonu ve sabit (kalıcı) olmaması ile ilgili problemleri azaltır. Her iki durumda da, hücreler (Agrobakterle enfekte olanlar veya biolistik uygulananlar) yeni geni veya genleri taşıyan bitkilere rejenere olurlar. Bu bitkiler test edilir, yoğun biçimde çoğaltılır ve nihayetinde yeni nesil genetiği değiştirilmiş bitki hatlarının eldesi için tohum sağlar.

Agrobacterium, *Rhizobiacea* familyasından gram negatif bir toprak bakterisidir ve iki türü bitkilerde kök boğazı kanseri *(A. tumefaciens)* ve saçak kök (*A. rhizogenes*) oluşumuna neden olan doğal genetik mühendistir. Bu hastalık Ti plazmidin (200 kb'den uzun) *Agrobacterium*'dan bitki genomuna transferi ile karakterize edilir. Bitki bu bakteri ile enfekte olduğunda, T-DNA olarak ifade edilen Ti plazmidin bir bölgesi bitkinin hücre çekirdeğindeki kromozomlardan birine entegre olur. T-DNA büyüme düzenleyicilerin sentezi için gerekli enzimleri kodlayan genleri içerir (Henzi, et al., 2000). Gen aktarımında kullanılacak DNA parçası, aktarılmak istenen gene ilave olarak sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için seçici bir işaret geni (marker) de içermelidir.



Şekil 2.2. Agrobacterium aracılığı ile gen transferi

2.1.2.2 Protoplast transformasyonu

Bu yöntemlerde, yüksek voltajlı elektrik akımı veya kimyasal maddelerle protoplast zarında DNA moleküllerinin geçebileceği büyüklükte geçici gözenekler oluşturularak, yabancı genleri taşıyan DNA parçasının hücre içerisine girmesi sağlanmaktadır (Özcan ve Özgen, 1996).

Mikroenjeksiyon; Bitkiye aktarılması istenen genleri taşıyan DNA parçası çok ince (0,5-10 µm çapında) kılcal pipetlerle veya enjektörlerle doğrudan immobilize edilmiş hedef hücrelere, kallus, meristem, mikrospor vb. içerisine steril şartlarda mikroskop altında enjekte edilmektedir. Mikroenjeksiyon için protoplastlar poly-L-lysine üzerine yapıştırılarak veya agarose içerisine gömülerek sabit hale getirilmektedir (Babaoğlu, 1999).

2.1.2.3 Biyolistik gen transferi (Partikül tabancası ile gen aktarımı)

Partikül tabancasıyla, spermidinle ağır metal partiküllerine (1-2 µm, altın veya tungsten) yapıştırılmış DNA parçalarının bitki hücre ve dokularına (yaprak, embriyo, sürgün ucu meristemi gibi organ kısımları), helyum gazı şokuyla bombardımanı yoluyla yapılmaktadır. A. tumefaciens aracılığıyla gen aktarımının zor olduğu birçok iki çenekli bitki türünde bu yolla transgenik bitkiler üretilebilmiştir (Babaoğlu, 1999).

Partikül bombardımanı metoduyla DNA parçası yerine doğrudan faj, bakteri veya maya hücreleri hedef dokuya transfer edilebilmektedir. Bu yolla yüksek moleküler DNA transfer edilebilir ve DNA izolasyonu ve saflaştırılması gibi zor işlemlerden sakınılabilir (Babaoğlu, 1999).

2.1.2.4 GDO ile ilgili yasal düzenlemeler

Genetik olarak değiştirilmiş organizmaların kullanımı – çevreye salınımı, ekimi, ithalatı ve özellikle gıda ve gıda katkısı olarak kullanımı – Avrupa Birliği içinde titizlikle uygulanan bir dizi işlemle düzenlenmiştir.

İlk hukuksal birlik dayanağı (Konsey Direktifi 90/220/EEC ve Konsey Direktifi 90/219/EEC) 1990’da insan ve hayvan sağlığını ve çevreyi korumak özel amacı ile oluşturulmuştur. Günümüzde temel hukuksal birlik dayanağı, Avrupa

Birliği içinde biyoteknoloji ile ilgili yatay kanuni çerçeve olarak kabul gören ve GDO'ların önceden tasarlanmış olarak çevreye salınımını da içeren Avrupa parlementosunun ve Konseyinin 12 Mart 2001 tarihli 2001/18/EC Direktifidir.

Konsey Direktifi 2001/18/EC, Konsey Direktifi 90/220/EEC'yi fesh ederek GDO'ların çevreye salınımı ile ilgili daha önceki kuralları kuvvetlendirmekte ve bu kapsamda çevresel risk değerlendirme prensipleri, pazara salınımından sonraki zorunlu (çevresel) gözlemleme, halkın bilgilendirilmesi zorunluluğu, pazara salınım için bütün safhaların etiketleme ve izlenebilirliği zorunluluğu ve moleküler kayıt envanterlerinin oluşturulması konularında yeni prensipler getirmektedir.

Direktif 2001/18/EC, Konsey Direktifi 90/220/EEC altında var olan muvafakatnamelerin uygunsuzluklardan kaçınmak için 2001/18/EC Direktifinin koşulları göz önünde tutularak yenilenmesini gerektirmektedir. Muvafakat yayınlandığı günden itibaren 10 yıl süre için geçerlidir. GDO yahut GDO içeren bir ürünün pazarda yer almasının ardından, muvafakat başvurusunu yapmış olan taraf (bildiren) muvafakat koşulları çerçevesinde pazara salınım sonrası izleme ve raporlama ile mükelleftir.

Ulusal kanunlar kapsamında her üye ülkede uygulanan Direktif 2001/18/EC, hem küçük ölçekli tarla denemeleri (deneysel amaçlar için gönüllü salınımlar, direktiftin B bölümü) hem de GDO'ların pazarlama koşulları (direktifin C bölümü) ile ilgilidir. Çizelge 2.6'da gösterildiği gibi daha önceki 90/220/EEC prosedürü kapsamında onay almış 18 GDO bulunmaktadır (15'i bitki kökenli, 3 tanesi için üye ülkeler muvafakatı). Bu güne dek Direktif 2001/18/EC kapsamında GDO'ların pazarda yer alması ile ilgili 25'den fazla muvafakiyet başvurusu yapılmıştır.

Çizelge 2.6. 90/220/EEC Direktifi altında AB'de pazarlanması onaylanan genetik olarak değiştirilmiş organizmalar

Ürün	**Hat**	**Tebliğ Eden**	**Bildirilen ana özellik**	**Komisyon kararı Sayı / Tarih**
Karanfil		Florigene	Değiştirilmiş çiçek rengi	20.10.98 MS Muvafakat
Karanfil		Florigene	Değiştirilmiş çiçek ömrü	20.10.98 MS Muvafakat
Karanfil		Florigene	Değiştirilmiş çiçek rengi	01/12.97 MS Muvafakat
Mısır	*Zea mays L.* MON810	Monsanto	BtcryIA(b) geninin ifadesi	98/294/EC 22 Nisan 1998
Mısır*	*Zea mays L.*	Novartis	Glufosinat amonyuma tolerans ve BtcryIA(b) geninin ifadesi	98/292/EC 22 Nisan 1998
Mısır	*Zea mays L.* Hat T25	AgrEvo	Glufosinat amonyuma tolerans	98/293/EC 22 Nisan 1998
İlkbahar Swede Kolza	*Brassica napus L. ssp oleifera*	AgrEvo	Glufosinat amonyuma tolerans	98/291/EC 22 Nisan 1998
Swede Kolza	*Brassica napus L. oliefera metzg, MS1,* RF1	Plant Genetic Systems	Glufosinat amonyuma tolerans	97/393/EC 6,6,1997
Swede Kolza	*Brassica napus L. oliefera metzg, MS1,* RF2	Plant Genetic Systems	Glufosinat amonyuma tolerans	97/392/EC 6.6.1997
Mısır	*Zea mays L.* Hat Bt176	CibaGeigy	Glufosinat amonyuma tolerans	97/98/EC 23.1.1997
Steril erkek hindiba**	*Cicharium intybus L.*	Bejo-Zaden BV	Glufosinat amonyuma tolerans	96/424/EC 20.5.1996
Soya Fasülyesi*	*Glycine Max L.*	Monsanto	Glifosinata tolerans	96/281/EC 3 Nisan 1996
Swede Kolza	*Brassica napus. L. oliefera Metzg.* MS1BnxRF1Bn	Plant genetic Systems	Glufosinat amonyuma tolerans	96/158/EC 6.2.96
Tütün	TB100x çeşit	SETTA	Bromoxynil toleransı	94/385/EC

*Avrupa Birliğinde ekimi onaylanmamıştır.

**Yanlızca tohum üretimi içindir.

258/97 Direktifi, gıda içeriği veya var olan gıdanın eşdeğeri olmayan gıda içeriği ya da yeni gıda haline gelen besinlerin yaygın kullanımı veya besin değeri ya da içeriğinde değişiklik yapılan gıdalardaki herhangi bir farklılığın son kullanıcı tarafından bilinmesini sağlamak amacı ile geliştirilmiştir. Günümüzde, genetiği değiştirilmiş vakalardan üretilen 17 gıda ürünü onaylanmış ve Avrupa Birliğinde resmi olarak satışa sunulabilmektedir (Çizelge 2.7). Bunlardan bir GD Soya ve bir GD Mısır, Orijinal Gıda Yasası zorunlu olmadan önce 90/220/EC direktifi çerçevesinde onay almıştır. Diğerleri (7 GD Kolza ve 5 GD Mısır'dan türetilen işlenmiş gıda ve 2 GD Pamuk tohumundan üretilen yağ) Orijinal Gıda Direktifine uygun olarak tebliğ edilmiş ve sadeleştirilmiş prosedür ile onaylanmıştır.

1139/98 Konsey Direktifi, herhangi bir genetiği değiştirilmiş gıda veya gıda içeriğinde genetik modifikasyon sonucu ortaya çıkan DNA veya protein belirlenebilir ise, bu ürünün GDO olmayan eşdeğeri ile eşit kabul edilmediği prensibine dayanır. Katkı maddeleri, Komisyon Direktifi 50/2000 devreye girene dek etiketleme düzenlemesi dışında değerlendirilmiştir.

1139/98 Direktifi, 10 Ocak 2000 tarihli Komisyon düzenlemesi (EC) 49/2000 ile tashih edilerek eşik kavramı tanımı getirilmiştir. Kasıtsız kontaminasyon probleminin üstesinden gelmek için konulan "eşik düzenlemesi" ile kanun iyileştirilmiştir. Bu yasa, gıda içeriğinde GDO'dan elde edilen materyaller bulunan gıda ürünlerinde, her bir ayrı materyal için %1'den fazla olmayacak oranda GDO taşıyan gıdalar için ek etiketleme zorunluluğu olmadığını taahhüt eder.

Buna ek olarak, bu materyalin varlığının tesadüfi olduğunun ispatı için operatörler, GDO kullanımından kaçınmak için gerekli tedbirlerin uygulandığının kanıtını sağlamak zorundadır.

GDO'lar ile ilgili çeşitli kullanıcı birliklerinin farklı ve çakışan görüşlere sahip olması, süreç boyunca yayınlanan yasal dayanakların yorumlanması ve uygulanmasındaki sıkıntılar, diğerlerinin yanında genetiği değiştirilmiş yemler için özel bir AB düzenlemesinin olmaması gibi sebepler bu konuda birleştirilmiş, güncellenmiş ve bütünsel yasal dayanaklara olan ihtiyaca dikkat çekmiştir.

Sonuç olarak Ekim 2003'de daha önceki yasal dokümanları iptal edip iyileştiren ve daha açık bilgi veren iki yeni düzenleme yayımlanmıştır.

Çizelge 2.7. Avrupa Birliğinde onaylanan genetiği değiştirilmiş (GD) gıdalar

	Vaka	Tahıl	Başvuran	Özellik	Potansiyel gıda	Tarih	Kanuni dayanak
1	GTS40/3/2	Soya	Monsanto	Böcek koruma ve herbisit dayanıklılığı	Soya gıdaları, soya içecekleri, tofu, soya	03.04.1996	Dir. 90/220/EEC Madde 13
2	Bt 176	Mısır	Ciba-Geigy	Böcek koruma ve herbisit dayanıklılığı	Mısır gıdaları, tane içeren mısır gıdaları,mısır	23.01.1997	Dir. 90/220/EEC Madde 13
3	TOPAS 19/2	Kolza	AgrEvo	Herbisit toleransı	Kolza tohumu yağı, kolza yağında yapılan kızartmalar, aperatifler	24.06.1997	Reg(EC) 258/97
4	MS/1/RF2	Kolza	Plant Genetic Systems	Herbisit toleransı		24.06.1997	Reg(EC) 258/97
5	MS1/RF1	Kolza	Plant Genetic Systems	Herbisit toleransı		24.06.1997	Reg(EC) 258/97
6	GT73	Kolza	Monsanto	Herbisit toleransı		21.11.1997	Reg(EC) 258/97
7	MON810	Mısır	Monsanto	Böcek direnci	Mısır türevleri, mısır yağı, mısır unu, şeker ve şurup, mısırdan yapılan aperatifler, fırınlanmış ya da kızartılmış gıdalar, şekerlemeler.	06.02.1998	Reg(EC) 258/97 madde 5
8	T25	Mısır	Agr/Evo	Herbisit toleransı		06.02.1998	Reg(EC) 258/97 madde 5
9	Bt11	Mısır	Novartis	Böcek direnci		06.02.1998	Reg(EC) 258/97 madde 5
10	MON809	Mısır	Pioneer	Böcek direnci		23.10.1998	Reg(EC) 258/97 madde 5
11	Falcon GS 40/90	Kolza	Hoechst / AgrEvo	Herbisit toleransı	Kolza tohumu yağı, kolza yağında yapılan kızartmalar, aperatifler	08.11.1999	Reg(EC) 258/97 madde 5
12	Liberator L62	Kolza	Hoechst / AgrEvo	Herbisit toleransı		08.11.1999	Reg(EC) 258/97 madde 5
13	MS8/RF3	Kolza	Plant Genetic Systems	Herbisit toleransı		26.04.2000	Reg(EC) 258/97 madde 5
14	1445	Pamuk	Monsanto	Herbisit toleransı	Pamuk yağı, pamuk yağından yapılan kızartmalar, aperatifler	19.12.2002	Reg(EC) 258/97 madde 5
15	531	Pamuk	Monsanto	Böcek direnci		19.12.2002	Reg(EC) 258/97 madde 5
16	pRF69/pRF93	*Bacillus subtilis*	F.Hoffmann - La Roche	Riboflavin	Vitamin B2	23.03.2000	Reg(EC) 258/97
17	Bt11	Mısır	Syngenta	Böcek direnci	Tatlı mısır	19.05.2004	Reg(EC) 258/97 madde 5

Bu iki yeni düzenleme; genetiği değiştirilmiş gıda ve yem hakkında 22 Eylül 2003 tarihli Konsey Avrupa Birliği Direktif (EC) 1829/2003 ve izlenebilirlik ve etiketleme ve GDO'lardan üretilen gıda ve yem ürünlerinin izlenebilirliği ve iyileştirilen Direktif 2001/18/EC ile ilgili 22 Eylül 2003 tarihli Konsey Avrupa Birliği Direktifi 1830/2003' tür.

1829/2003 (EC) Kanunda, güvenlik değerlendirmesi ile ilgili kurallar kuvvetlendirilmiş ve genişletilmiştir. Bu kanun, ilk defa GD yem ile ilgili özel kuralları belirler ve bugüne kadar **1139/98 ve 49/2000 (EC)** komisyon düzenlemesinin içinde kapsanan GD gıda ve GD yem için etiketleme ihtiyaçlarını kapsar.

1829/2003 EC Kanunu altında (18 Nisan 2004'den itibaren zorunlu) onay için başvuran kişi- kurum, sorgulama altındaki vaka için bir tayin metodunu da içeren tam bir dosya sunmalıdır. Dosya özellikle çevre ve gıda güvenliği risk değerlendirme bölümleri Avrupa Gıda Güvenlik otoritesi tarafından değerlendirilir (28 Ocak 2002 tarihli Konsey ve Avrupa parlamentosu 178/2002 Kanunu). Aday tarafından sunulan tayin yöntemleri AB Referans Laboratuvarları (1829/2003 Kanunu ile kurulan) tarafından değerlendirilir ve onaylanır.

Kanunda etiketlendirme için minimal seviye belirlenmiştir. 49/2000 Komisyon Düzenlemesi kapsamında, resmi onayı bulunan bir GDO'nun tesadüfi varlığı için belirlenen %1 sınır seviyesi %0,9'a düşürülmüştür. Buna ek olarak, onaylanmamış GDO'ların tesadüfi varlığında, ilgili bilimsel kurul(lar)ın olumlu görüş belirtmesi durumunda %0,5 sınır seviyesi, geçici kural olarak belirlenmiştir.

AB, bilgilendirme ve etiketlemeyi, tüketicilerin bilgili tercih yapması için bir araç olarak tanımlar. 1997'den itibaren bir ürünün GDO olduğu veya ürün içinde GDO varlığının etiketlendirilme ile belirtilmesi zorunludur.

Eğer nitel analiz GDO varlığını işaret ediyorsa, etiketleme zorunluluğu kapsamında karar verilebilmesi için nicel testler yapılır.

Yasama işleminin yeni iç elemanı: Birlik Referans Laboratuvarı (European Union Reference Laboratory, EURL) resmi olarak sisteme girer. 1829/2003 (EC) Kanun şartlarında Avrupa GDO laboratuvarı ağı tarafından desteklenen Ortak Araştırma Merkezi JRC (Joint Research Center) Gıda ve Yem'de Birlik Referans

Laboratuvarı (EURL) olarak tayin edilmiştir (http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/). Bu laboratuvarlar ihtilaf durumunda teknik ve bilimsel yardım sağlamak ve mevzuat muvafakatı amacını sağlayacak analitik yöntemleri değerlendirme ve onaylama vekaletine sahiptir.

Yasanın temel içeriği, hassas ve sağlıklı analiz yöntemleri bulunmasını gerektirmektedir. Bu durum, AB'deki bütün GDO yürürlülük ve kontrol laboratuvarlarında, analitik prosedür ve performansları harmonize eden ve standart yaklaşımı garanti altına alan bilimsel araştırma aktivitelerini gerektirir.

AB kontrol laboratuvar prosedür ve performanslarının standardizasyonu ve harmonizasyonu, JRC tarafından bundan bir kaç sene önce kontrol mevzuatının herhangi bir aşamasının başarısı için olmazsa olmaz olarak işaret edilmiştir.

JRC Sağlık ve Tüketici Koruma Enstitüsünün Moleküler Biyoloji ve Genomik Birimi, 1999'dan beri GDO'lar ile ilgili konularda çalışan yetkili kontrol laboratuvarları arasında zorunlu bir ağ oluşturulmasını önermiş ve halihazırda da desteklemektedir.

Aralık 2002'den beri Avrupa Birliğinde resmi olarak GDO laboratuvarları için zorunlu bir ağ bulunmaktadır. Bu ağ ENGL (European Network of GMO Laboratories http://engl.jrc.ec.europa.eu/) olarak adlandırılmıştır ve Avrupa Komisyonu (DG Joint Research centre – JRC) tarafından koordine edilmekte ve AB üyesi tüm ülkelerin yani sıra İsviçre ve Norveç de dahil olmak üzere kontrol laboratuvarlarını temsil eden yaklaşık 100 laboratuvarı içine almaktadır. Bu ağ için başkanlık ve genel sekreterlik görevleri JRC Sağlık ve Tüketici Koruma Enstitüsünün bir birimi olan "Moleküler Biyoloji ve Genomik Birimi"nin sorumluluğu altındadır. Amaç, GDO'ların – çevre örnekleri, gıda, yem ve tohumda – örnekleme, tanı, belirleme ve ölçümü konularında uzmanlaşmış birimler için ortak bir platform yaratmak ve böylelikle

• Nitel ve nicel analizler için yöntem geliştirilmesi

• Moleküler biyoloji teknoloji transferi ve kapasite geliştirimi

• Var olan GDO miktarlarının tespiti veya çeşitli ortamlarda GDO taraması ve varlığının tayini için uygun yöntemlerin yeterlilik ve geçerliliğinin sağlanması

• Referans materyaller (Bu çalışma paketi için sorumluluk JRC Referans materyaller ve Ölçümler Enstitüsünde bulunmaktadır.)

• Farklı GDO hammaddeleri için örnekleme stratejileri ve prosedürleri (tohumlar, tahıllar, ham materyal, son tüketici ürünleri, vb.)

• Moleküler verileri içeren veri tabanlarının kurulması ve GDO'ların birim tanımlaması için ihtiyaçlar ve veri tabanı ve biyoinformatik yaklaşımları gibi alanlarda ihtiyaçların belirlenmesi ve giderilmesi adına ortak bir tanım ve tartışma zemini oluşturmaktır (Querchi et al., 2006).

GDO'larla ilgili uluslararası en önemli yaklaşım Kartagena Biyogüvenlik Protokolünde ortaya konmuş ve benimsenmiştir. Bu protokol 11 Eylül 2003 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Protokol, Türkiye Cumhuriyeti Devleti tarafından 2004 yılında imzalanmıştır. Bugün bu protokolü imzalamayan ülkeler halen mevcuttur (Aslan, 2011).

Amacı; "Bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerden kaynaklanabilecek riskleri engellemek, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve ekolojik çeşitliliğin korunması, sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla biyogüvenlik sisteminin kurulması ve uygulanması, bu faaliyetlerin denetlenmesi, düzenlenmesi ve izlenmesi ile ilgili usul ve esasları belirlemek" olan ve 18.03.2010 tarihinde yürürlüğe giren 5977 sayılı "Biyogüvenlik Kanunu" gereğince GDO ve ürünlerinin onay alınmaksızın piyasaya sürülmesi, kullanılması veya kullandırılması, genetiği değiştirilmiş bitki ve hayvanların üretimi, GDO ve ürünlerinin piyasaya sürme kapsamında belirlenen amaç ve alan dışında kullanımı, GDO ve ürünlerinin bebek mamaları ve bebek formülleri, devam mamaları ve devam formülleri ile bebek ve küçük çocuk ek besinlerinde kullanılması yasaktır (Anon., 2010a). Kanun gereği, GDO ve ürünleri ile ilgili başvuruların değerlendirilmesi ve kanunun 9'uncu maddesinde belirtilen görevlerin yürütülmesi için "Biyogüvenlik Kurulu" oluşturulur. Kurul: uzmanlar listesini oluşturmak; uzmanlar listesindeki kişilerden seçilen bilimsel komiteleri oluşturmak; her bir başvuru için uzmanlar listesinden bilimsel komitelerin üyelerini seçmek; risk ve sosyoekonomik değerlendirme raporlarını dikkate alarak kurul kararlarını oluşturmak; izleme raporlarına dayanarak kararın kısmen veya tamamen iptali ile yasaklama, toplatma, imha ve benzeri yaptırımlara ilişkin kararlarını Bakanlığa sunmak; etik komite oluşturmakla görevlidir (Anon.,

2010a). Biyogüvenlik Kanunu, izin alınmış olsa dahi, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması ve sürdürülebilirliğinin sağlanmasına karşı oluşan zararlardan GDO ve ürünleri ile ilgili faaliyetlerde bulunanları sorumlu tutmaktadır. Kanun hükümlerinin ihlal eden kişiler, 3 yıldan 12 yıla kadar hapis ve yüklü miktarda adli para cezası ile cezalandırılacaktır (Anon., 2010a). 13.08.2010 tarihinde yürürlüğe giren ve 5977 sayılı "Biyogüvenlik Kanunu"na dayanan "Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik" ile "Bilimsel ve teknolojik gelişmeler çerçevesinde, modern biyoteknoloji kullanılarak elde edilen genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerinden kaynaklanabilecek risklerin engellenmesi, insan, hayvan ve bitki sağlığı ile çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması için; a) Gıda ve yem amaçlı genetik yapısı değiştirilmiş organizma ve ürünleri ile ilgili başvuru, değerlendirme, karar, ithalat, işleme, ihracat, etiketleme, izleme, piyasaya sürme, denetim ve kontrole; b) Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ile ilgili araştırma, geliştirme ve deneysel amaçlarla yapılacak faaliyetlerin, harici çevre ile temasını önleyecek şekilde, kontrollü şartlar altında, sınırlandırılmış belirli bir alanda denemelerinin yapılmasına; c) Genetik yapısı değiştirilmiş mikroorganizmalar ve ürünleri ile ilgili araştırma, geliştirme, başvuru, değerlendirme, karar, ithalat, ihracat, işleme, etiketleme, piyasaya sürme, izleme, denetim, kontrol ve kapalı alan faaliyetlerine dair usul ve esasları belirlemesi" amaçlanmıştır (Anon., 2010b). 5977 sayılı "Biyogüvenlik Kanunu" gereği; herbisit tolerans genini içeren A2704-12 soya fasulyesi ve ürünlerinin; herbisit tolerans genini içeren MON40-3- 2 soya fasulyesi ve ürünlerinin; herbisit tolerans genini içeren MON89788 soya fasulyesi ve ürünlerinin yalnızca hayvan yemlerinde kullanılmasına izin verilmiştir (Anon., 2011b). Buna göre ülkemize GDO'lu gıda ithalatına izin verilmemektedir. GDO'lu yemlerin ise onaylı genlerde %0,9'üzerinde ise etiketlenmesi gerekmektedir.

2.3 GDO Analiz Yöntemleri

Transgenik bitkiler genomlarına yeni gen veya genlerin eklenmesi ile karakterize edilirler. Aktarılan bu yeni gen ile yeni bir protein ifade edilir. Bu da bitkiye bazı böceklere ve/veya yabancı otlara direnç gibi yeni bir özellik kazandırır. GDO tanı teknolojisinin temelini değiştirilmemiş çeşit ile transgenik bitki arasındaki bu farkın kullanılması oluşturur. Bu işlem aktarılan yeni DNA'nın veya ifade edilen yeni proteinin belirlenmesi yahut (eğer enzim ise) enzimatik reaksiyonların ürününü tespit etmek için kimyasal analiz yöntemleri kullanılması yolu ile olur.

Günümüzde mısır, soya, pamuk gibi tarla bitkilerinde genetik modifikasyonların belirlenmesi için iki bilimsel yaklaşım kullanılmaktadır. Birincisi, ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay) antijen ve antikor arasındaki bağlanma özelliğini kullanarak özel proteinlerin varlığını test eder, diğeri PCR (Polymerase Chain Reaction), tahıla aktarılmış olan DNA sekanslarının belirlenmesine dayanır. Bu yöntemler örnekteki miktar (yüzde) hakkında bilgi verebilir. AB'de geçerliliği onaylanan ilk yöntem, pazara sunum için onaylanan birçok GDO'nun tespit edilebildiği PCR'a dayalı tayin yöntemidir (Lipp et al., 1999).

2.3.1 Elisa yöntemi

Transformasyon sonrasında aktarılan gen tarafından sentezlenen yeni proteinin özel immunolojik tayini, genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin belirlenmesi için alternatif bir yaklaşımdır. Ancak genetik modifikasyonun her zaman yeni bir proteinin sentezlenmesini yönlendirmediği ve protein ifade seviyelerinin analiz metotları için her zaman yeterli olmayacağı bilinmektedir. Buna ek olarak bazı proteinler bitkinin sadece özel bölgelerinde (özel amaçlar için genellikle dokuya özel (doku hedefli) promotörler kullanılır) ya da fizyolojik gelişimin farklı fazlarında veya belli bölgelerde farklı seviyelerde ifade edilebilir.

En kuvvetli konstitütif promotörler kullanıldığında bile, transgenik ürünlerin ifade seviyelerinin bitkilerde toplam çözünen proteinin yüzde 0 ile 2 arasında olduğu belirtilmiştir (Longstaff, 1995). Birçok durumda, ifade seviyeleri (örneğin onaylanmış GD tahıllar) üst sınır yüzde ikiden daha azdır (Hemmer, 1997).

İmmunoanalizler, antikorları test maddesi olarak kullanan analitik ölçüm sistemleridir. Antikorlar hayvanların serumundan izole edilen ve spesifik üretimlerine yol açan (antijen) maddeye fiziksel olarak tutunan özel proteinlerdir. Antikorlar, tespiti gereken maddeyi (örneğin CP4 EPSPS, herbisit Roundup®'a direnç sağlayan protein) fare, tavşan gibi deney hayvanlarına enjekte ederek vücut hücrelerinin yabancı olarak tanımladıkları bu proteine karşı antikor üretmesi ile elde edilir. Antikorlar saflaştırılır, tespit edilebilir bir işaretleyici ile imlenir ve ilgi duyulan maddenin tayininde kullanılır.

İmmunolojik yöntemlerin geliştirilmesi için ilk koşul, tanımlanacak yeni protein için yüksek hassasiyette antikorların bulunmasıdır. Buna ek olarak,

numune ya da ilgi duyulan proteinlerin önemli derecede parçalanmamış olması tayin için önemlidir.

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi: Bir immunosorbent (katı bir desteğe bağlı antijen veya antikor) ve enzim bağlı bir immunoreaktant (tepki veren) kullanılan bir enzim immuno analizidir. Çeşitli yöntemler (işaretlenmemiş bilinmeyen ile işaretli reaktant arasındaki yarışçı bağlanma) bilinmeyen derişimleri ölçmek için kullanılır.

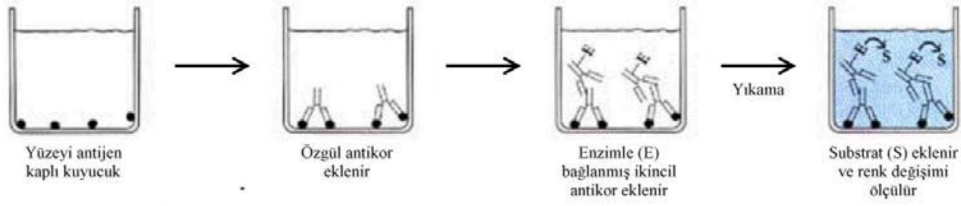
ELISA yönteminde antijen ve antikorlar arasındaki özel etkileşim esastır. ELISA'daki anahtar ayraç moleküller, antijen adı verilen yabancı maddelere karşı vücut bağışıklık sistemi tarafından üretilen antikor adı verilen çözünür proteinlerdir. GDO'ların belirlenmesi durumunda bu antijen, genetik modifikasyon sonucu sentezlenen yeni protein olabilir.

ELISA deneysel safhada yeni aktarılan gen tarafından sentezlenen protein ifade seviyesinin belirlenmesinde kullanılır. Bu nedenle, özel antikorların üretimi ve kullanımı ile ilgili bilgiler transgenik bitkilerin geliştirilmesi ile ilgili pek çok makale de bulunabilir (Mohapatra et al., 1999).

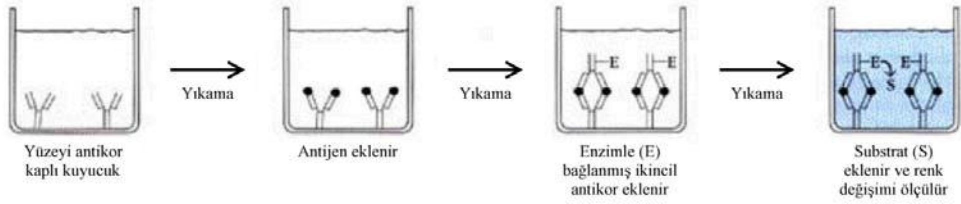
Onaylanan genetiği değiştirilmiş tahıllarda kullanılan transgenlerin ürünleri olan proteinlere karşı kullanılabilecek özgün antikorlardan sadece bir kaçı ticari olarak mevcuttur. Buna örnek olarak nptII gen ürününe (npt II ve APH(3')II) ve gus gen ürününe karşı olan antikorlar örnek verilebilir.

ELISA testi 3 farklı yöntemle gerçekleştirilebilir:

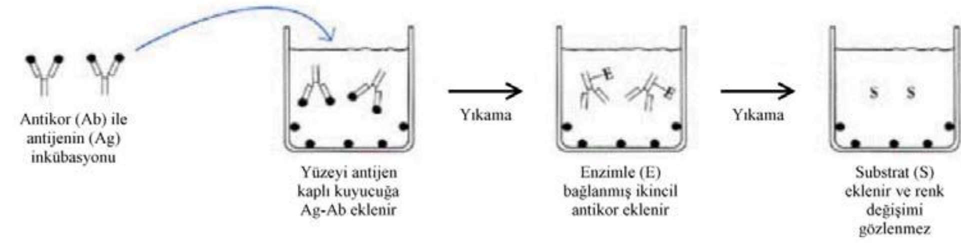
(a) Dolaylı ELISA



(b) Sandviç ELISA



(c) Rekabetçi ELISA



Şekil 2.3. Elisa yöntemleri

Roundup Ready® soya için özel bir belirleme yöntemi olarak ELISA'ya bağlı bir teknik geliştirilmiş, test edilmiş ve onaylanmıştır (Lipp et al., 2000).

Yöntem, Roundup Ready® soyada herbisite karşı direnci sağlayan protein CP4 EPSPS enzimine (5-enolşikimat-3-fosfat sentaz) (Agrobacterium sp. Suş CP4) karşı özel antikorların kullanımına dayanır (Padgette et al, 1995). İlk sonuçlarda bu yöntem (ticari ELISA kiti ile) kullanılarak ham soyada (işlenmemiş) GDO varlığı %0,3 ve %0,5 arasındaki derişimlerde belirlenebilmiştir.

2.3.2 PCR

1985 yılında K. Mullis ve arkadaşları tarafından PCR (Polymerase Chain Reaction)'ın bulunmasıyla moleküler biyoloji ve moleküler tıp yenilenmiştir. PCR, bir DNA zincirinin bilinen iki parçası arasında uzanan özel bir DNA bölümünün enzimatik olarak çoğaltıldığı *in vitro* bir tekniktir. Başlangıçta belirli bir genin sadece küçük bir parçası elde edilebilirken, günümüzde PCR

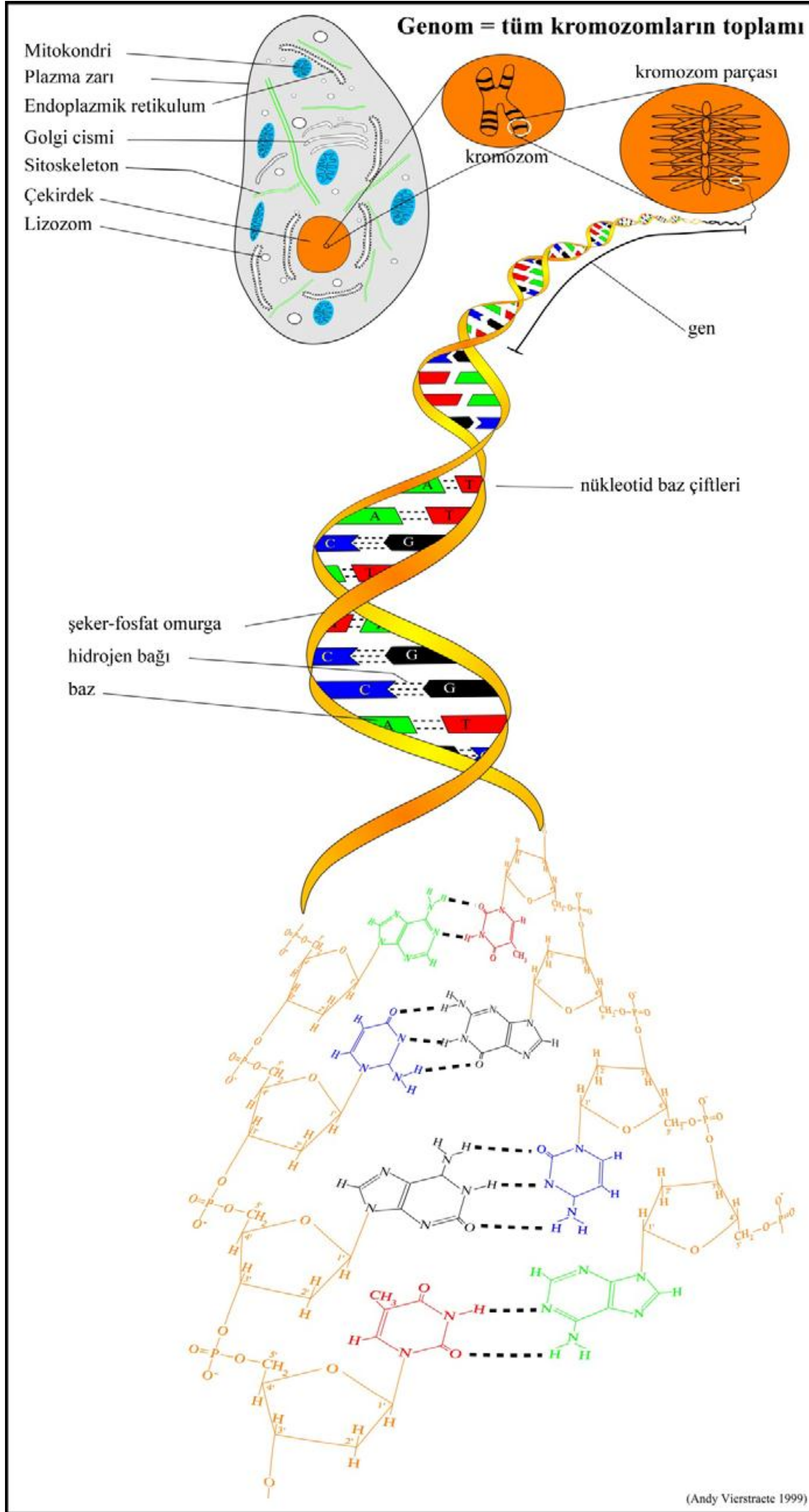
kullanılarak birkaç saat içinde tek bir gen kopyasından milyonlarca kopya çoğaltılabilir.

DNA genetik bilgiyi taşıdığı nükleotidlerin sekansında şifrelenmiş olarak saklayan, fosforik asit ve deoksiriboz ünitelerinin oluşturduğu iki paralel zincirin, pürin ve pirimidin bazılarınca çapraz olarak bağlanması ile ortaya çıkan sağ yönlü sarmal yapıya sahip bir moleküldür. Ökaryot hücrelerde DNA’nın çoğu çekirdek içinde bulunur ve kromozomal DNA olarak adlandırılır. Çift katlı bir zar (çekirdek kılıfı) ile hücrenin geri kalanından (sitoplazma) ayrılır.

DNA bir organizmanın yapısını ve fonksiyonunu bütünüyle tanımlayan tüm genetik bilgiyi içerir. Genetik bilginin aktarımından üç farklı işlem sorumludur:

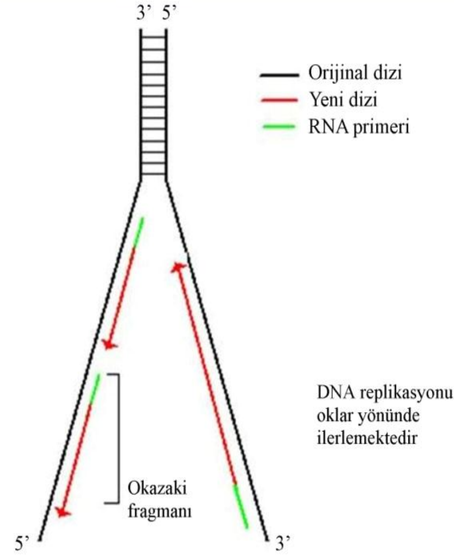
- Replikasyon
- Transkripsiyon
- Translasyon

Replikasyon esnasında çift iplikli bir nükleik asit molekülü, eş kopyalar verebilmek için birebir çoğaltılır. Bu işlem genetik bilginin değişmeden korunarak sürekliliğini sağlar. Transkripsiyon sırasında, bir gene karşılık gelen DNA parçası okunarak tek iplikli bir RNA sekansı ile ifade edilir. Bu RNA molekülü çekirdekten sitoplazmaya hareket eder. Translasyon sırasında RNA sekansı sitoplazmada, protein oluşturan aminoasit zincirine çevrilir (Alberts et al., 1983).



Şekil 2.4. Hücrede DNA'nın yapısı

DNA replikasyonu PCR amplifikasyonunun dayandığı işlemdir. Replikasyon sırasında, DNA molekülünün çift sarmal yapısı çözülerek açılır ve her iplik, yeni bir tamamlayıcı ipliğin sentezi için ata olur. Her yavru molekül bir eski bir de yeni DNA ipliğinden oluşur ve ana molekülün birebir kopyasıdır.



Şekil 2.5. Replikasyon çatalı

PCR hücre içinde (*in vivo*) DNA'nın kendini eşlemesi mekanizmasına dayanır. Çift zincirli DNA (dsDNA), tek zincirli DNA (ssDNA) biçimine çözülür, kopyalanarak çoğaltılır ve tekrar bağlanır. Bu teknik;

• çift sarmal DNA'nın yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelmesi: denatürasyon

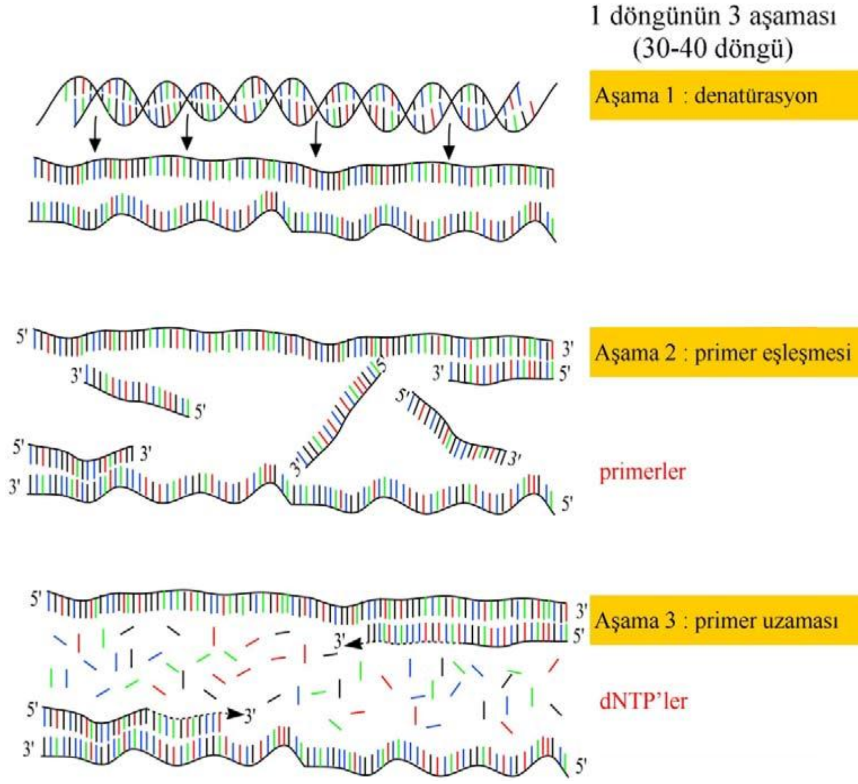
• primer olarak kullanılan iki oligonükleotidin hedef DNA'ya bağlanması: primer eşleşmesi

• Mg+2 iyonlarının varlığında, katalizör olan DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenmesi ve DNA zincirinin uzaması: primer uzaması

İşlem döngülerin birçok tekrarından oluşur.

Genellikle kısa zincirlerden oluşan oligonükleotidler, birbirlerinden dizi olarak farklıdır. Primerlerin sekansı, çoğaltacak hedef DNA'ya komşu tanımlama bölgelerine eştir. Denatürasyon, primer birleşmesi ve primer uzaması PCR

metodunda bir döngüyü oluşturur. Şekil 2.6' da PCR işlemindeki üç ana basamak gösterilmektedir.



Şekil 2.6. PCR çoğalmasının basamakları (resim Andy Vierstraete,1999)

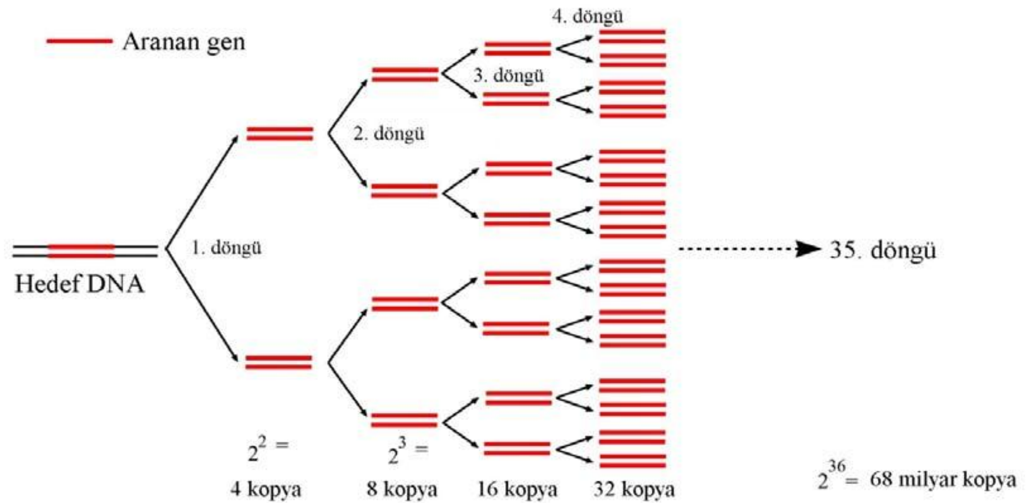
Template Denatürasyonu: Denatürasyon esnasında, çift sarmal çözülür, bütün enzimatik reaksiyonlar durur (örn. bir önceki döngüdeki uzama). İki eş zincir artan sıcaklık ile birbirinden ayrılır. Bu işlem denatürasyon (bozulma) olarak adlandırılır. DNA denatürasyonunu sağlamak için sıcaklık yaklaşık 93-96°C 'ye çıkarılır. Bu sayede kuvvetli hidrojen bağları kırılır ve eşleşmemiş bazların sayısı artar. Ortamdaki tüm çift sarmal (ds) DNA, tek sarmal (ss) DNA formuna dönüştüğünde reaksiyon tamamlanır. Mevcut dsDNA'nın yarısının tek sarmal haline dönüştüğü sıcaklık Tm, erime sıcaklığı olarak bilinir. Kullanılan çözücü, tuz derişimleri ve ortam pHsı denatürasyon işlemini etkiler. Örneğin, düşük tuz derişimlerinde, yüksek pH ve formaldehit gibi organik çözücülerin varlığında Tm düşer. DNA'nın içerdiği nükleotid çiftlerinin oranı yani G/C ve T/A miktarları da Tm değerini etkiler. G/C miktarı yüksek olan DNA'nın Tm'i, T/A miktarı yüksek olan DNA'ya göre daha yüksektir.

Primer Eşleşmesi: DNA zincirlerinin eşleşmesi veya yeniden bağlanması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir (genellikle 55-65°C). Sıcaklık düşünce,

birbirine eş iki ssDNA zinciri yeniden bağlanarak dsDNA oluşturur. Bu fazda, tek zincir primerler ile tek zincir hedef DNA arasında hidrojen bağları oluşur ve kırılır. Hedef DNA'ya tam olarak eşleşen primer ile ana zincir arasındaki bağlar daha sağlam ve uzun süreli olur. Ortaya çıkan bu küçük dsDNA parçası (primer-template) üzerine DNA polimeraz bağlanarak ana zinciri kopyalamaya başlar. Birkaç baz eklendikten sonra primer ve template arasındaki iyonik bağ kuvvetlenir ve kırılmaz.

Primer Uzaması: Sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (genellikle Taq DNA Polimeraz) ile dNTP'lerin varlığında primerler hedef zincir boyunca uzatılır. Bu reaksiyon başlangıçtaki hedef DNA materyalinin iki katına çıkması ile sonuçlanır (birebir kopyalama). Taq Polimerazın optimum çalışma sıcaklığı 72°C'dir. Primerler bir kaç baz uzadıktan sonra, hedef DNA'ya karşı daha yüksek iyonik çekime sahip olurlar. Bu da yapılan işlemin geri dönüşünü engeller. Tam olarak eşleşmeyen (uyuşmayan) primerler yüksek sıcaklıktan dolayı gevşer ve böylelikle reaksiyon DNA parçasının uzaması ile sonuçlanmaz. Ana DNA'ya eş olan bazlar primere 3' kısmından bağlanır. Polimeraz ana zinciri 3'-5' yönünde okurken, 5'-3' yönünde dNTP ekler. Primer uzama basamağının süresi, çoğaltılacak DNA uzun ise arttırılabilir. Ancak genellikle PCR deneylerinde 1 dakikalık uzama zamanı tam sentez için yeterlidir (Querchi et al., 2006).

İdeal koşullarda her döngü sonunda 2^n sayıda kopya oluşur.



Şekil 2.7. DNA'nın PCR ile üstel çoğaltılması

2.3.3 Real- Time PCR

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR metodu, eş zamanlı PCR'dır (RT-PCR)(Xu et. al., 2011). Son ürün analizlerinden farklı olarak bu PCR sistemleri, reaksiyonun gerçekleştiği zamanla eş zamanda reaksiyonu görüntüler. Bu sistemlerdeki PCR reaksiyonunda, ardı ardına gerçekleşen döngülerde üretilen PCR ürününün miktarı orantılı biçimde yayılan bir florasan sinyali ile ilişkilendirilmiştir. Her bir reaksiyon döngüsünde, üretilen PCR ürününün miktarı ile orantılı olarak bu sinyal artar. Her bir döngüde florasan sinyal miktarı kayıt edilir ve logaritmik faz boyunca PCR reaksiyonu görüntülenir. Florasan sinyalinin ilk önemli artışı, hedef DNA'nın başlangıçtaki miktarı ile ilişkilidir (Ahmed, 2002).

Higuchi et al., (1992, 1993), PCR ürünlerinin biriktikçe tespit edilebildiği bir sistem kurarak, PCR kinetiğinin analizine öncülük etmişlerdir. Bu eş zamanlı PCR sistemi, her reaksiyon karışımına, DNA'ya bağlanma özelliği olan etidiyum bromid eklenmesi prensibi ile işlemekteydi. Numunelerin üzerine UV ışınları yayacak ve bilgisayar kontrollü soğutulmuş CCD kamera ile ortaya çıkan florasanı tespit edebilecek şekilde modifiye edilmiş PCR aleti kullanılıyordu. Amplifikasyon olduğunda üretilen dsDNA miktarı artıyor ve etidiyum bromid ile bağlanıyor, bu da floresan sinyalinde bir artışa neden oluyordu. Floresan ışığının yayılma miktarına karşı döngü sayısı bir grafiğe dökülerek sistem amplifikasyon grafikleri oluşturuluyordu. Belirli sayıdaki döngüden sonra ürün birikimini ölçümlemektense PCR sürecinin bütünü böylelikle izlenmiş oluyordu.

RT-PCR yönteminin hassasiyeti, amplifikasyon reaksiyonunu oluşturmak ve izlemek için kullanılan kimyasal yöntemlere ve oluşan sinyali gözlemlemek için kullanılan cihaza bağlıdır. Bu amaç için geliştirilmiş pek çok kimyasal vardır: İnterkalatör boyalar (etidiyum bromid, SYBR Green I), hibridizasyon probları (TaqMan probları, FRET probları, moleküler fenerler, scorpions vb.).

2.3.3.1 SYBR Green I boyasına dayalı RT-PCR sistemleri

Higuchi et al., (1992, 1993), etidiyum bromid yerine, daha az toksik, daha spesifik, ve daha duyarlı (10'dan ve 25 kata kadar) florasan bir dsDNA inter kalatör ajanı olan SYBR Green I boyasını kullanarak ilk RT-PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Haugland, 2002).

SYBR Green I boyası, dsDNA'nın ikincil oluğuna bağlanırken ssDNA'ya bağlanamaz. Bu bağlanmanın sonucu olarak florasan yayımı (eksitasyon 254 ve 488 nm, emisyon 560 nm) ortalama 800 ile 1000 kat artar. PCR başladığında yeni sentezlenen DNA miktarının artması, florasan sinyalinin de artmasına neden olur. SYBR Green I tabanlı sekans tespit sistemlerinin en önemli zorluğu, bu molekülün spesifik olmayan DNA'yı da tanıma ihtimalidir. Bu sebeple aslında PCR reaksiyonlarında bulunan bütün dsDNA moleküllerinin, ki buna spesifik olmayan PCR ürünleri ve primer-dimerler de dahildir, miktarı ölçülür. Bu problemin üstesinden gelmek ve spesifik olmayan PCR ürünlerinden dolayı oluşan bu miktar tayin bileşenini hesaplamadan çıkartmak için erime eğrisi (melting curve) analizi yapmak mümkündür. PCR'ın en son aşamasından sonra ürünler düşük hızda eritilir ve açığa çıkan florasan verileri toplanır. Her farklı dsDNA spesifik bir erime sıcaklığına sahip olduğu için tek bir reaksiyon karışımındaki farklı erime sıcaklığına sahip olan bileşenler ölçülebilir. Böylelikle spesifik olmayan girdilerin toplam ölçümden çıkarılması mümkün olur (Weighardt et al., 2006).

2.3.3.2 Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) probları

FRET probları verici florofordan, alıcı fluorofora enerji transferine dayalıdır (Şekil 2.8.) (Haugland, 2002). FRET için temel prensipler:

- Verici ve alıcı moleküller yakın olmalıdır.

- Alıcı absorbsiyon spekturumu, vericinin yayılım spekturumu ile örtüşmelidir.

- Verici ve alıcı dipol geçişleri hemen hemen paralel olmalıdır.

Verici ve alıcı floroforlar birbirlerine yakın iseler, vericinin mavi ışıkla uyarılması enerji transferi ile sonuçlanır. Alıcı böylelikle daha uzun dalga boylarında ışık yayacaktır. PCR ürünlerinin oluşumu, PCR primerlerinin yanısıra, hibridizasyon probu olarak adlandırılan, floresanla işaretlenmiş iki adet sekans spesifik olgonükleotid prob kullanarak görüntülenir. Hibridizasyon probları çift olarak dizayn edilir ve çiftlerden biri verici boya (3'-Floresein), diğeri ise alıcı boya (5'-Red-640 veya 5'-Red-705) ile işaretlenir.

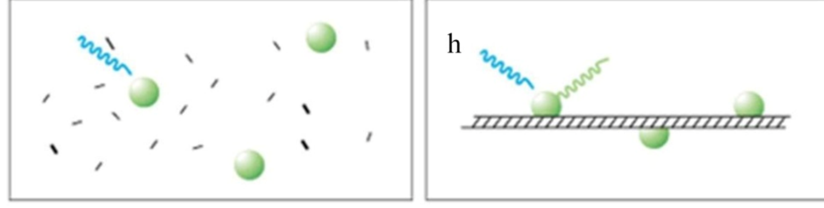
FRET, uzaklığın 6. kuvveti ile orantılı azaldığı için hibridizasyon probları, hedef DNA'nın birbirine yakın bölgelerine hibridize olacak şekilde tasarlanır (genellikle iki bağlanma bölgesinin arasında 1-5 nükleotidlik boşluk olur). Eğer iki prob da hibridize olur ise, iki boya da birbirine yakınlaşır ve FRET alıcı boyası flourimetre ile ölçülebilen sinyale neden olur.

2.3.3.3 Degredasyon probları (TaqMan prensibi)

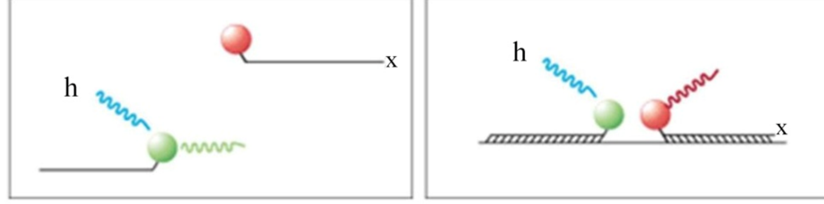
TaqMan ölçümü, PCR esnasında Taq polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini degredasyon probunu kesmek için kullanır (Querci et al., 2006). Degredasyon probu (ya da TaqMan probu) genellikle 20-30 baz uzunluğunda bir oligonükleotidtir. Tm'leri genellikle primerlerin Tm'lerinden 10°C yüksektir. 5' ucunda raportör (haberci) floresan boya 3' ucunda quencher (söndürücü) boya bulundurur (Şekil 2.8.). 3' ucu bloke olduğu için prob primer gibi uzamaz. Hedef DNA'nın varlığında prob, PCR reaksiyonu boyunca spesifik olarak sağ ve sol primer bölgeleri arasına bağlanır.

Prob sağlam durumda iken raportör boyanın quencher boyaya yakınlığı, özellikle Forster tipi enerji transferi sebebiyle, haberci floresanın baskılanmasına neden olur (Forster, 1948; Lakowicz, 1983). Reaksiyon esnasında Taq DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi, eğer hedef DNA ile hibridize olmuş durumda ise, haberci ve söndürücü boyalar arasındaki probu degrede eder. Bu, amplifikasyon ilerledikçe floresanın artmasına neden olur. PCR ürününün birikimi haberci boya florasanında artış görüntülenmesine yol açar. Bu işlem, her döngüde tekrarlanır ve ürünün eksponansiyel birikimini etkilemez. FRET problarından farklı olarak degredasyon probları her bir döngüde, bir önceki yayıma yeni boya ekleyerek floresan salar. Sonuç olarak florasan sinyali her bir döngüde artar. TaqMan ölçümü, evrensel termal döngü parametreleri ve PCR reaksiyon şartları kullanır. Florejenik problar için özel gereksinim 5' ucunda G bazının olmamasıdır. Haberci boyaya bitişik G bazı kesimden sonra bile haberci florasanı söndürür.

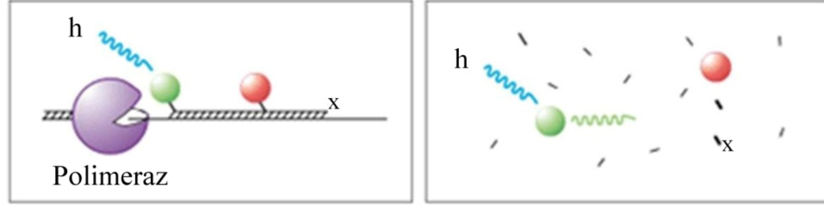
I. SYBR Green



II. Hibridizasyon Probları



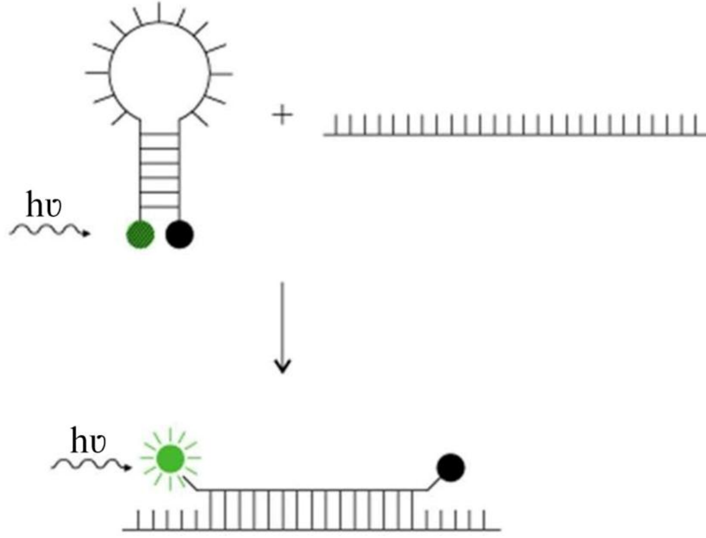
III. TaqMan Probları



Şekil 2.8. Eş zamanlı PCR ilkeleri

2.3.3.4 Moleküler Beacon (ikaz ışığı)

Moleküler Beacon molekülleri stem-loop (ilmek) yapısı içerecek şekilde tasarlanmış DNA problarıdır. Loop (halka) sekansı probun spesifik hedefine, stem (gövde) sekansı ise kendi içinde tamamlayıcıdır (Şekil 2.9.) (Tyagi and Kramer, 1996). Probun 5' ve 3' uçları fluorofor (haberci) ve quencher (söndürücü) boyalara kovalent olarak bağlanmıştır. Stem-loop yapısı kapandığında flourofor ve quencher yakınlaşır. Bu durumda fluorofor tarafından yayılan bütün fotonlar, quencher tarafından emilir. Komplementer sekansların varlığında prob açılır ve hedefe hibridize olur. Floruofor quencherdan uzaklaşır ve prob florasan sinyali vermeye başlar (Weighardt et al., 2006).

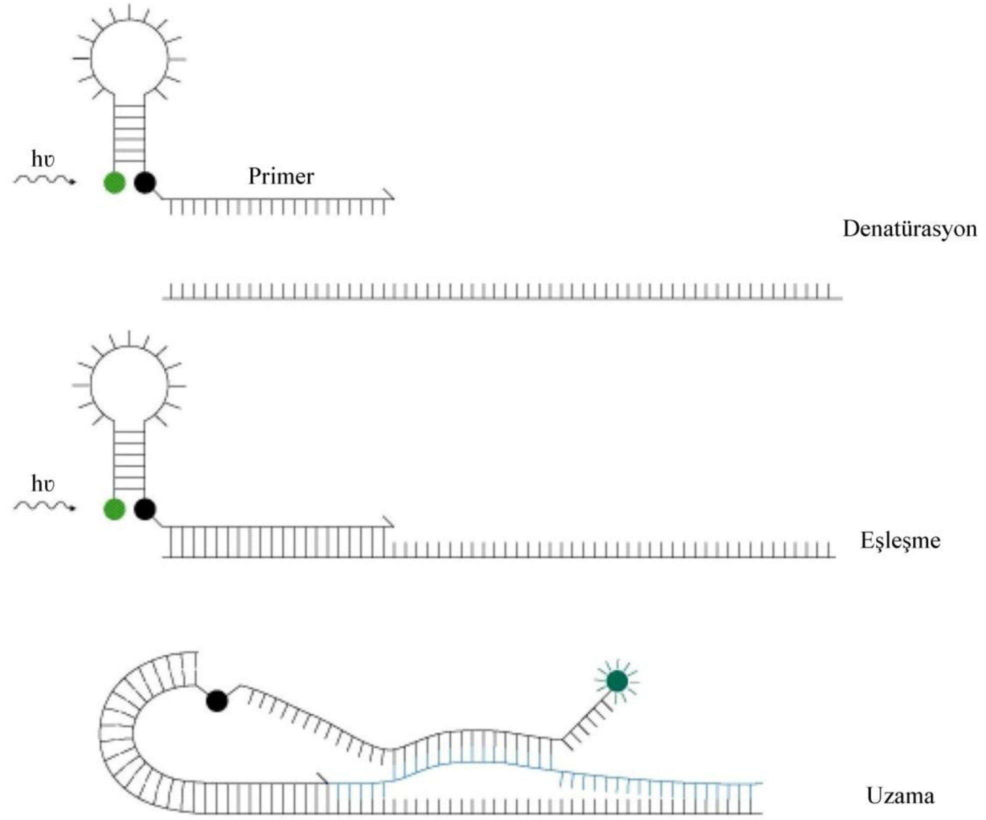


Şekil 2.9. Molecular beacon ilkesi

2.3.3.5 Scorpions

Diğer bir gelişme, "Scorpions" olarak adlandırılan prob ailesidir. Bir Scorpion stem- loop yapısı taşıyan spesifik prob sekanslarından oluşurlar (Şekil 2.10) (Thelwell et al., 2000).

Probun 5' ucuna bağlı sinyal üreten florofor, stem-loop konfigürasyonunda 3' ucuna bağlı bir molekül tarafından söndürülür. Bu stem-loop yapı, primerin 5' ucuna bağlanmıştır. Scorpion primerinin uzamasını takiben amplifikasyon sırasında spesifik prob aynı DNA ipliği üzerinde kendi tamamlayıcı sekansına bağlanır. Bu bağlanma sonucu saç tokası ilmeği (hairpin loop) çözülür. Böylelikle floresan söndürülemez ve gözlenen sinyal değeri artar. Primer ile stem sekansı arasına yerleştirilen bir PCR susturucu, saç tokası ilmeğinin baştan sona okunmasını ve bu da özel hedef sekans yokluğunda saç tokası ilmeğinin açılmasını engeller. Tek molekül üzerinden bağlanma özelliği, homojen prob sistemlerine kıyasla bazı avantajlar sağlar. Moleküler Beacon, TaqMan ce FRET analizlerinin aksine, Scorpion ölçümleri primerlerden başka ayrı bir prob gerektirmez.

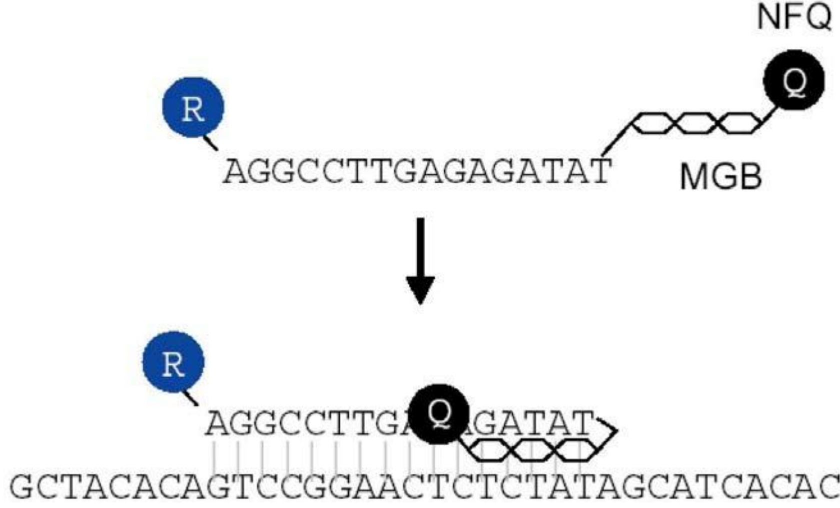


Şekil 2.10. Scorpion probları ilkesi

2.3.3.6 TaqMan MGB (Minor groove binder, ikincil oluk bağlayıcı) probları

MGB çift sarmal DNA'nın minor oluğuna tam olarak oturan, küçük, hilal biçimli bir moleküldür (Kutyavin et al., 2000). TaqMan problarında MGB grubu quencher boya ile birlikte 3' uca bağlıdır (Şekil 2.11). TaqMan probu hibridize olduğunda, MGB, prob ve hedef sekans arasında oluşan çift sarmal DNA'nın minor oluğunu kuşatarak bağlanmayı dengeler. Çift sarmalda nükleotidler mükemmel bir şekilde eşlendiğinde bu dengeleme çok daha etkilidir (örneğin, sekans hiç yanlış eşlenmediğinde). Ayrıştırıcı gücünün yanında, arttırılmış stabilizasyon, genel prob tasarımı kurallarına hala uyulurken, TaqMan MGB problarının TaqMan standart problarıyla (genellikle 18-40 mer) karşılaştırıldığında çok kısa olması demektir (genellikle 13-20 mer). TaqMan MGB probları özellikle multipleks ölçümler olmak üzere nicel PCR için çok avantajlıdır. Geliştirilmiş spektral performans, farklı ölçümler için duyarlılığı ve tutarlılığı mümkün kılarken, arttırılmış hibridizasyon özelliği hedef ayrıştırmayı kolaylaştırır. Ayrıca, daha küçük problar, sekansa özel koruma veya sapma aralıkları gibi daha kısa hedef bölgelere uygun problar geliştirilmesine alan

sağlayarak ölçüm yapılmasını kolaylaştırabilir. Amplikon boyutu iç-ölçüm tutarlılığını geliştirebilecek daha da kısa MGB probları kullanılarak minimuma indirilebilir.



Şekil 2.11. MGB probları ilkesi

2.3.4 Şerit yöntemi

Bu yöntem zar temelli tespit sistemi olarak bilinmektedir. Bu zar iki korumalı bölge içermektedir. Birinci bölge transgenik proteini bağlamakta, diğeri ise renk maddesini tutmaktadır. Kağıt şerit, belirli bölgede antikoru tutmak için kullanılmaktadır. Çoğu test kiti bu şekilde hazırlanmaktadır. Bu test şeridi, çözelti haline getirilmiş örnek solüsyonuna daldırılır ve örnek kapillar yolla hareket eder. Örnek antikora doğru gider ve orada toplanır böylece ilgilenilen proteince daha yüksek yoğunluklu bant elde edilmektedir. Elde edilen bantlar yardımıyla GDO'lu ürüne ait protein belirlense de miktar tayini yapılamaz. Bu testler ile daha çok kalitatif veya yarı kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir (Okumuş ve Öner, 2012).

2.3.5 Bioassay yöntemi

Bu teknik, özellikle tohumlara uygulanmaktadır. Tohumlar çimlendirilerek yabancı ot ilacı püskürtülerek, canlılıkları kontrol edilmektedir. Fosfat kökenli ilaçlara dayanıklılığın saptanması, direnç geninin aktarıldığını ortaya koymaktadır (Okumuş ve Öner, 2012).

2.3.6 Biosensör yöntemi

Hedef DNA'nın tespiti için nükleik asit hibridizasyon sağlayan nükleik asit sensörüdür. DNA probu sensör yüzeyi üzerine imobilize edilmiştir. Hedef dizi çözeltide serbest halde bulunmaktadır. Hibridizasyon işlemi ise real-time da gerçekleşmektedir (Wang, 2000; Deisingh and Badrie 2005; Elenis et al., 2008; Bai et al., 2010).

2.3.7 NIR yöntemi

NIR (Near Infrared Imaging- Yakın Kızıl Ötesi Görüntüleme) adıyla anılan bu yöntem, örnekten alınacak partiküllerin NIR cihazıyla resimlenmesi sonucu elde edilen floresan profillerinin çıkarılması işlemidir. Bu profillerde resmin herhangi bir noktasındaki farklı dalga boyunda çekilen resimlerden elde edilen spektrofotometrik değerler bulunur. Böylece örneğe ait sıradan bir resim değil, her noktası içerdiği moleküllere ait bir kesit bulunduran zengin bir veri kaynağı elde edilmiş olmaktadır. NIR cihazıyla, floresan kesitlerinin tanımlanmasında kullanılan spektrofotometrik ölçümler, 900 nm'den başlayıp, her biri 10 nm artarak, 1700 nm'ye kadar farklı dalga boylarındaki resimlemelerle elde edilir. Bu resimler örneğin karmaşık kimyasal yapısını ortaya koymaktadır. Elde edilen bilginin güvenilirliğini garantilemek için her bir örneğe ait resimleme işlemi iki kez tekrar edilmektedir (Okumuş ve Öner, 2012; Roussel and Cagdill, 2004).

2.3.8 Mikroarray teknolojisi

Son yıllarda, yeni bir teknoloji olan DNA mikroarray teknolojisi biyologlar ve biyomedikal araştırmacılar arasında oldukça büyük ilgi çekmiştir. Moleküler biyoloji alanındaki araştırmaların hızını önemli derecede arttıran yeni ve güçlü bir teknolojidir. DNA mikroarray kavramı 1995 yılında Brown tarafından tanımlanmış olup oldukça yüksek verimde nükleik asit analizi sağlama kapasitesinden dolayı birçok araştırmanın konusu olmuştur. DNA mikroarray analizleri şu anda tek bir uygulama ile binlerce hatta milyonlarca farklı DNA dizisini analiz etme imkanı sağlamaktadır. Mikroarray'lerin hassasiyeti, diğer moleküler yöntemlerle belirlenmesi çok zor olan küçük farklılıkların tespit edilmesini de mümkün kılmaktadır.

İki nükleotid zincirinden oluşan DNA'nın çift iplikli sarmal yapısının belirlenmesi modern moleküler biyolojide bir dönüm noktası olmuştur. DNA

karakterizasyonu yapan yöntemlerin çoğu, DNA'nın iki koplementer tek iplikten kısmen veya tamamen komplementer olan çift sarmala şekillenme yeteneği olan hibridizasyona dayanmaktadır. Hibridizasyon tepkimeleri çözeltideki iki komplementer molekül arasında veya çözeltideki bir molekül ve katı bir destek üzerindeki hareketsiz bir komplementer molekül arasında meydana gelebilir. DNA çip yöntemleri de tek iplikli floresan moleküller ve çip yüzeyindeki tek iplikli dizeler arasındaki hibridizasyon tepkimelerinden yararlanır. Hibridizasyon, tüm DNA mikroarray endüstrisinin temel aldığı biyokimyasal bir yöntemdir (Schena and Davis, 2001; Eickhoff et al., 2002; Özkaralı, 2007).

Genellikle cam, naylon membran veya silikon yapıdaki katı yüzeyler üzerinde minyatürize alanlara yerleştirilmiş milyonlarca kısa tek iplikli DNA dizisi (prob), antikor veya epitopik belirteçler aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon gibi özgün kimyasal bağlanma temeline dayanan bir prensiple incelenmesi tekniğidir (Bai et al., 2010). Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, "microchip", "DNA chip" ve "DNA array" gibi tanımlamalar da benzer uygulamaları ifade etmek için kullanılmaktadır. Bununla birlikte insitu oligonükleotit sentezi tekniği ile üretilmiş olan yüksek yoğunluklu mikroarray platformları çip olarak ifade edilirken, "DNA array" terimi özellikle cam lamlar üzerinde hazırlanan daha küçük kapasiteli platformlar için tercih edilir. Genel olarak mikroarray teknolojisinin en önemli özelliği, küçük bir alanda çok sayıda genomik incelemenin yapılmasına olanak sağlamasıdır (Saraçlı, 2007; Deisingh and Badrie, 2005; Kok et al., 2003, Dijk et.al., 2010; Querci et al., 2010., Spielbauer and Stahl, 2005).

Mikroarray'in Kullanım Alanları

Mikroarray'ler biyolojik araştırmalarda birçok soruya yanıt bulmak için kullanılmaktadır. Biyoçiplerin yani mikroarray'lerin ilk uygulama alanları gen ekspresyon analizleridir. Buna ek olarak hibridizasyona dayalı yöntemler; mutasyon taraması, polimorfizm analizleri, DNA haritalama ve evrimsel çalışmalarda da kullanılabilmektedir. Mikroarray'ler ayrıca proteinlerin nükleik asitlere, küçük moleküllere ve diğer proteinlere bağlanmasının izlenmesinde de kullanım alanı bulmuşlardır. Ancak bu uygulamalar henüz geliştirilmemiştir. Hibridizasyon analizleri genomik DNA'nın hem kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerindeki tek baz değişimleri, delesyonlar ve insersiyonların belirlenmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda DNA dizisinin miktarının ölçülmesinde de kullanılabilmektedir (Özkaralı, 2007).

Mikroaaray teknolojisi bugüne kadar tıp ve mikrobiyoloji alanlarında uygulama alanı bulmuştur. Önümüzdeki yıllarda da bitki ve gıda biliminde yaygın olarak kullanılacağı düşünülmektedir (Kok et al., 2003).

Tipik bir genomik mikroarray çalışmasının beş temel basamağı vardır

1. Hedef DNA/cDNA dizilerine komplementer diziler içeren oligonükleotitler yani probların immobilize edildiği mikroarray platformunun hazırlanması veya ticari olarak temin edilmesi

2. İncelenecek numuneden floresan ile işaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA’nın hazırlanması

3. İşaretlenmiş cDNA/DNA/cRNA ile mikroarray platformunun hibridizasyon solüsyonu içerisinde karşılaştırılması

4. Yıkama sonrasında platform yüzeyinde hibridizasyonun varlığının lazer teknolojisi kullanan bir tarayıcı veya okuyucu aracılığıyla analiz edilmesi ve görüntünün bir bilgisayarda depolanması

5. Depolanan görüntünün bir yazılım aracılığıyla değerlendirilmesi ile mikroarray platformu üzerindeki hangi noktalarda hibridizasyon olup olmadığının ve niceliksel olarak düzeyinin (koyu mavi-yeşil-sarı-kırmızı renk yelpazesinde) değerlendirilmesi ve yorumlanması.

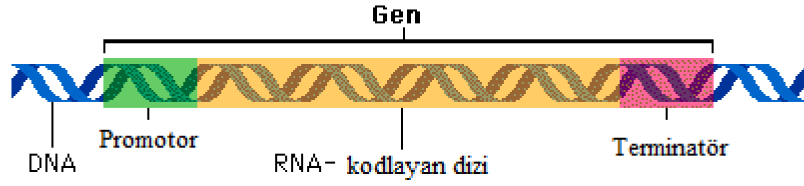
Postgenomik mikroarray analizlerinin genomik olanlardan tek farkı, nükleik asitler arasında test edilen hibridizasyon reaksiyonu yerine, benzer incelemenin antikorlar ile özgün epitopik determinantlar arasında gerçekleştiriliyor olmasıdır (Saraçlı, 2007).

Mikroarray teknolojisinde ilk olarak iki ayrı örnekten izole edilen messenger RNA (mRNA)’lardan RT (Reverse Transkriptans) yöntemi ile cDNA’lar sentezlenir. Sonra bu örneklerin biri siyanin 3 (cyanine, Cy3) ve diğeri siyanin 5 (cyanine, Cy5) boyasıyla etiketlenip işaretlenerek iki farklı probu oluşturur. Cy5 ve Cy3 iki farklı boya olup farklı emme ve uyarılma (excitation) özelliğine sahip olmalarından dolayı kırmızı ve yeşil olmak üzere 2 farklı renk üretirler. Bu iki farklı boyayla etiketlenip işaretlenen ve iki farklı örnekten elde edilen cDNA’lar karıştırılır ve oligonükleotidları veya cDNA baz dizilerini içeren

ve binlerce geni ifade eden DNA mikroarrayleriyle hibridizasyon için kullanılır. Genomdaki her bir geni temsil eden bu cDNA parçacıkları hibridizasyon sırasında farklı sinyaller vermektedir. Hibridizasyon sırasında üretilen sinyallerin yoğunluğu örneklerdeki mRNA miktarları ile orantılıdır. Sonra bağlanmayan probları uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapılır. Daha sonra boyaların ışıkla uyarılmasıyla oluşan kırmızı ve yeşil renkteki Cy3 ve Cy5 sinyalleri array tarayıcıları yardımıyla farklı dalga boylarında okunur. İki farklı dalga boyunda elde edilen Cy3 ve Cy5 sinyallerinin oranları bir cDNA parçacığının iki farklı probdaki yoğunluğunu ifade eder. Bu sinyallerin yoğunluklarını karşılaştırmak ve analiz sonuçlarını sayısal olarak belirlemek için bu amaçla hazırlanmış bilgisayar programları kullanılmaktadır. Bu programlar sayesinde hibridizasyon sonucunda mikroarrayden elde edilen sinyaller bilgisayarda birleştirilerek üç farklı renkte görüntülenir. Elde edilen bu görüntüde kırmızı renk, herhangi bir mRNA'nın prob 1'de prob 2'ye göre fazla olduğunu, sarı renk, mRNA'nın iki farklı probda da eşit miktarlarda bulunduğunu, yeşil renk ise, mRNA'nın prob 2'de prob 1'e göre daha fazla olduğunu ifade etmektedir. Daha sonra her bir sinyalin ortalaması alındıktan sonra mikroarrayde kendiliğinden oluşabilecek sinyal çıkartılıp ve her bir değer için normalizasyon işlemi farklı koşullarda ekspresyonu değişmeyen temel bir genle (housekeeping gene) veya sinyal yoğunluğu bilinen herhangi bir mRNA kullanılarak yapılır. Normalleştirilen bu veriler gen ekspresyon profillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Duggan et al., 1999; Moody, 2001; Aharoni and Vorst, 2001; Çevik, 2005).

2.3.9 GDO'larda temel genetik elementler

Yabancı bir proteini sentezlemek üzere gen aktarılan, ticari olarak mevcut GDO bitkiler bazı ortak genetik elementler içerirler. Aktarılan DNA dizisi en azından promotor dizi, protein kodlayan gen ve bir terminatör dizi içerir. Promotor dizi açma kapa düğmesi gibi hareket ederek, genin mRNA'ya transkripsiyonunu kontrol eder. Terminatör bölge genin transkrisyon prosesini durdurur (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. GDO' lu bir gen kaseti

2.3.9.1 Başlıca promotorlar

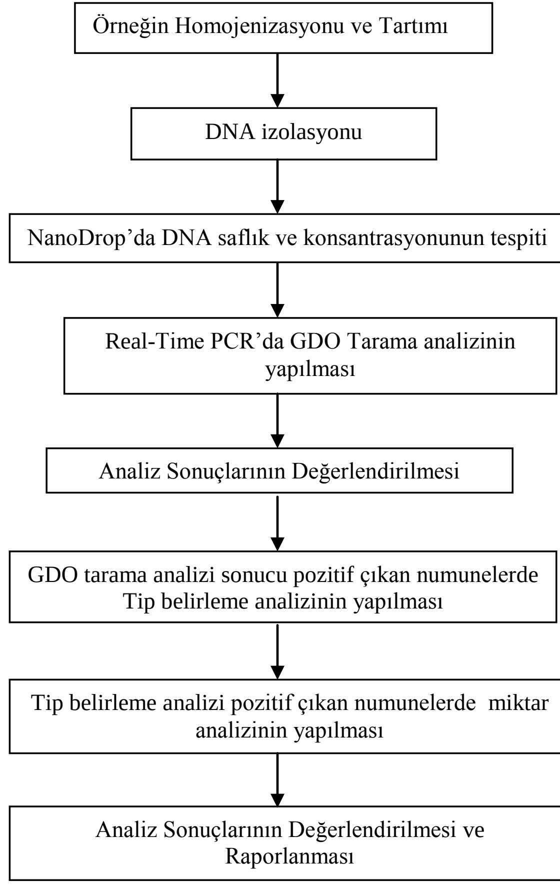
Promotorlar gen kasetinin 5' ucunda yer alan, RNA polimeraz tarafından tanınan ve hedef genin transkripsiyonu için gerekli transkripsiyon faktörü DNA dizileridir (Browning and Busby, 2004). Tütün mozaik virüsünden aktarılan 35S promotor ve diğer türevleri (FMV) onaylanan pek çok transgenik üründe en sık kullanılan promotor dizileridir. Bu nedenle pek çok GDO tespit yöntemi bu promotor dizileri tespit etmeye dayanır (Matsuoka et al., 2002).

2.3.9.2 Terminatörler

Terminatörler transkripsiyon protein kompleksinin çözünmesi yolu ile gen transkripsiyonunu durduran DNA dizileridir. Terminatör dizi gen dizisinin sonunda ya da 3' ucunda yer alır. *A. Tumefaciens* napoline sentez geninden aktarılan (T-NOS) onaylı GDO mahsüllerinde en sık kullanılan terminatördür (Arne et al., 2012).

2.3.10 GDO analiz basamakları

Günümüzde GDO tarama ve miktar analizlerinde sıklıkla kullanılan ve en doğru sonuç veren yöntem Real- Time PCR yöntemidir. Şekil 2.13'de Real Time PCR için GDO analiz basamakları görülmektedir.



Şekil 2.13. GDO Analiz basamakları

2.3.10.1 DNA izolasyonu

Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması çoğu moleküler biyolojik çalışmada ve rekombinant DNA tekniklerinin tümünde ilk adımdır. Nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin amacı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanarak bir GD spesifik analiz için farklı kaynaklardan nükleik asit saflaştırılmasını sağlamaktır. Nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı PCR analizleri için en önemli faktörlerden bazılarıdır. Yüksek saflıkta, inhibisyon bulaşanlarından arındırılmış nükleik asitleri elde etmek için, uygun ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır. PCR analiz performansını inhibe eden olası bulaşanlar Çizelge 2.8'de listelenmiştir (Somma et al., 2004).

Çizelge 2.8. Bazı inhibitör maddeler

İnhibitör	**İnhibisyon Konsantrasyonu**
SDS	>%0,005
Fenol	>%0,2
Etanol	>%1
İzopropanol	>%1
Sodyum asetat	>5 mM
Sodyum Klorit	>25 mM
EDTA	>0,5 mM
Hemoglabin	>1 mg/ml
Heparin	>0,15 i.u./ml
Üre	>20 mM

Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve pürifikasyonu için çok çeşitli yöntemler vardır, en uygun tekniğin seçimi genellikle aşağıdaki kriterlere bağlıdır:

• Hedef nükleik asit

• Kaynak organizma

• Başlangıç materyali (doku, yaprak, tohum, işlenmiş materyal vb.)

• İstenen sonuçlar (verim, saflık, pürifikasyon için gerekli süre)

• Bir sonraki uygulama (PCR, klonlama, işaretleme, blotlama, RT-PCR, cDNA sentezi),vs

Nükleik asitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için günümüzde en yaygın olarak kullanılan bazı yöntemlerin ilkeleri aşağıdaki bölümlerde açıklanacaktır.

Biyolojik materyalden nükleik asitlerin ekstraksiyonu hücre parçalanması, hücre nükleazların inaktivasyonu ve nükleik asitlerin parçalanmış hücreden ayrımını gerektirir. Genellikle ideal parçalama prosedürü birtakım tekniklerin bileşiminden oluşur. Bu süreç karmaşık başlangıç materyalini (doku gibi) parçalayacak kadar sert, ancak hedef nükleik asidi koruyacak kadar da nazik olmalıdır. Temel parçalama prosedürü aşağıdaki yöntemlerle gerçekleştirilebilir:

• Mekanik parçalama (öğütme, hipotonik parçalama gibi)

• Kimyasal uygulama (deterjanlarla parçalama, tiol ile redükleme, kaotropik katkı maddeleri gibi)

• Enzimatik parçalama (Proteinaz K gibi)

Hücre içi nükleazların inaktivasyonu ve hücre membranının parçalanması işlemleri birleştirilebilir. Örneğin, tek bir çözelti hücre membranını parçalamak için deterjanlar, hücre içi enzimleri inaktive etmek için de güçlü kaotropik tuzlar içerebilir. Hücre lizizi ve nükleaz inaktivasyonundan sonra hücre içi diğer faktörlerin uzaklaştırılması filtrasyon veya presipitasyon (çökeltme) gibi işlemlerle kolayca yapılabilir.

Hücre ekstraktlarından nükleik asitlerin saflaştırılması yöntemleri genellikle aşağıdaki tekniklerden iki veya daha fazlasının birlikte kullanımını gerektirir (Zimmermann et al., 1998):

Ekstraksiyon / presipitasyon

Çözücü ekstraksiyonu nükleik asitlerden kontaminantları uzaklaştırmak için sıklıkla kullanılır. Örneğin, fenol ve kloroform kombinasyonu proteinleri uzaklaştırmak için, izopropanol ve etanol ile presipitasyon genellikle nükleik asitleri konsantre etmek için kullanılır. Hedef nükleik asitlerin miktarı düşük olduğunda, presipitasyonun etkisini artırmak için karışıma bir inert taşıyıcı (glikojen gibi) ilave edilebilir. Nükleik asitlerin diğer presipitasyon yöntemleri yüksek konsantrasyonlu tuz (salting out) kullanılarak yapılan seçici presipitasyon ve pH'daki değişiklikler kullanılarak yapılan protein presipitasyonunu içerir.

Kromatografi

Kromatografi yöntemleri jel filtrasyonu, iyon değişimi, seçici adsorpsiyon veya affinite ile bağlanma gibi farklı ayrıştırma tekniklerinden oluşabilir. Jel filtrasyonu, jel partikülleri porlarının moleküler eleme özelliği ile işler. Belirli por çapına sahip bir matriks daha küçük moleküllerin difüzyon yolu ile porlara girişine izin verir, daha büyük moleküller porlar tarafından içeri alınmaz ve boş hacimle ayrıştırılırlar. Böylece moleküller molekül büyüklüğü azalışına bağlı olarak sırayla elüye edilir. İyon değişimi kromatografisinde, bir hedef molekül ve

kolon matrisindeki fonksiyonel gruplar arasındaki elektrostatik interaksiyondan yararlanılır. Nükleik asitler (yüksek negatif yüklü, lineer polianyonlar) iyon değişimi kolonundan basit tuz tamponları ile ayrıştırılır. Adsorpsiyon kromatografisinde, nükleik asitler diğer biyolojik moleküllerin aksine, belirli tuzlar varlığında (örn. kaotropik tuzlar vb.) seçici olarak silika veya cam yüzeyler üzerine tutunur. Daha sonra düşük konsantrasyonlu bir tuz tamponu veya su ile nükleik asitleri, bir sonraki uygulamada direkt olarak kullanabilen bir örnek oluşturacak biçimde, ayrıştırmak mümkündür.

Santrifügasyon

Seçici santrifüj güçlü bir saflaştırma yöntemidir. Örneğin yüksek g-gücünde kendi kendine oluşan CsCl gradientlerdeki ultrasantrifügasyon, plazmit saflaştırması için uzun süredir kullanılmaktadır. Genellikle, santrifüj bir başka yöntemle kombine edilerek kullanılır. DNA ve RNA'yi daha küçük kontaminantlardan (tuzlar, nükleotidler, vb) tampon değişimi veya büyüklük tespiti amacıyla saflaştırmak için jel filtrasyonla santrifügasyonu birleştiren spin kolon kromatografisi buna bir örnektir. Bazı prosedürler, kromatografik bir matriks üzerindeki selektif adsorpsiyon ile santrifugal elüsyonu bir nükleik asit çeşidinin seçici saflaştırılmasi için kombine eder.

Afinite kolon ayrımı

Son yıllarda birçok saflaştırma yöntemi nükleik asitlerin afinite immobilizasyonunu manyetik ayrıştırmayla birleştirmiştir. Örneğin, poly(A)+mRNA, biyotin işaretli oligo(dT) ile streptavidin kaplı manyetik partiküllere bağlanabilir. Bu bağlanmış partiküller solüsyondan ve bağlanmamış kontaminantlardan bir mıknatıs yardımı ile ayrıştırabilir. Bu katı faz tekniği, santrifugasyon, organik ekstrasyon ve faz ayrıştırmanın bazı aşamalarını basit, hızlı bir manyetik ayrıştırma ile yaptığı için nükleik asit saflaştırma olayını basitleştirir (Somma et al., 2004).

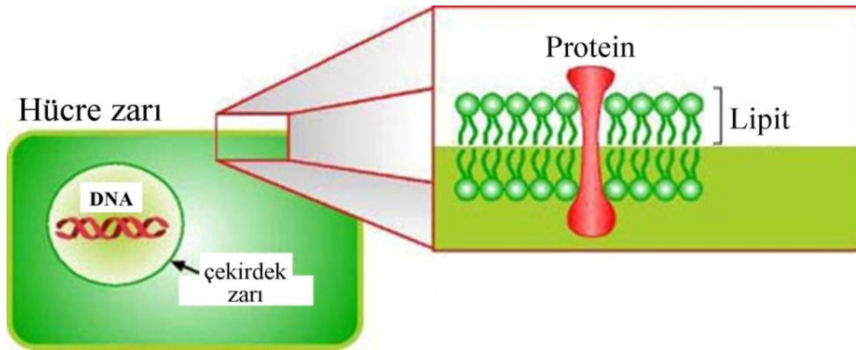
➢ CTAB ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemi

İlk kez Murray ve Thompson tarafından 1980'de geliştirilen CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) protokolü Wagner ve arkadaşları tarafından 1987'de yayınlanmıştır (Wagner et al., 1987). Bu yöntem bitki ve bitki kaynaklı gıda maddelerinden DNA ekstraksiyonu ve pürifikasyonu için kullanılır.

Yöntem özellikle polisakkaritlerin ve polifenolik bileşenlerin elimine edilmesine uygundur; diğer bir deyişle saf DNA eldesi ve dolayısıyla da DNA kalitesinde etkilidir. Bu prosedür bitki moleküler genetiğinde yaygın bir biçimde kullanılmakadır ve GDO'ların saptanabilmesi için yapılan validasyon denemelerinde test edilmiştir (Lipp et al.,1999; 2001). Birkaç değişiklik tekniğin birçok ham ve işlenmiş gıda matriksinde kullanılabilmesi için geliştirilmiştir (Hupfer et al., 1998; Hotzel et al., 1999; Meyer and Jaccaud, 1997; Poms et al., 2001).

Bitki hücreleri, az tuzlu bir ortamda nükleik asitlerle birlikte çözünmez bir kompleks oluşturan, iyonik bir deterjan olan CTAB ile lize olabilir. Bu koşullarda, polisakkaritler, fenolik bileşenler ve diğer kontaminantlar süpernatantta kalır ve ortamdan yıkama ile uzaklaştırılabilir. DNA kompleksi tuz konsantrasyonu arttırılarak çözünülür ve etanol ve izopraponal ile presipite edilir.

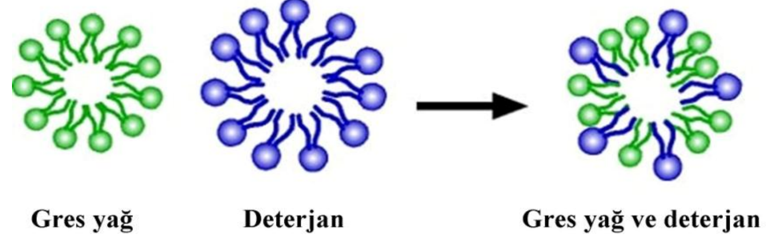
Hücre duvarı lizizi: DNA ekstraksiyonunun ilk aşaması hücre ve çekirdek duvarlarının parçalanmasıdır. Bu amaçla, homojenize örnek ilk aşamada EDTA Tris/HCl ve CTAB içeren ekstraksiyon tamponu ile muamele edilir. Bütün biyolojik membranlar kovalent olmayan bağlarla birbirine bağlı lipit ve protein moleküllerinden oluşan temel bir yapıya sahiptir.



Şekil 2.14. Hücre membranlarının basit gösterimi (Genetic Science Learning Center, University of Utah http://gslc.utah.edu)

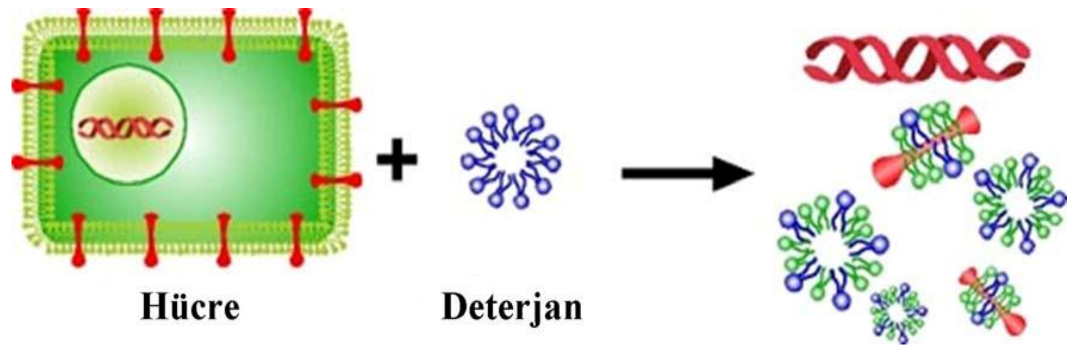
Şekil 2.14'de gösterildiği gibi, lipit molekülleri, içinde protein moleküllerinin bulunduğu, süreklilik gösteren bir çift tabaka biçiminde dizilmiştir. Lipit molekülleri baş olarak isimlendirilen hidrofilik uçlar ve kuyruk olarak isimlendirilen hidrofobik uçlardan oluşur. CTAB yönteminde membran lizizi, ekstraksiyon tamponu içinde bulunan bir deterjan (CTAB) ile yapılır. Lipitler ve deterjan benzer kompozisyonlara sahip olduğu için, ekstraksiyon tamponunun

CTAB bileşeni hücre ve çekirdek membranını oluşturan lipitleri tutma özelliğine sahiptir. Bir deterjan kullanılarak çözünen lipitlerin mekanizmasi Şekil 2.15’de gösterilmektedir.



Şekil 2.15. Lipit çözünmesi

Şekil 2.16, hücre membranının CTAB ekstrasyon tamponuna maruz kaldığında deterjanın genomik DNA’yı çıkararak lipitleri ve proteinleri nasıl yakaladığını göstermektedir. Spesifik bir tuz (NaCl) konsantrasyonunda, deterjan nükleik asitlerle çözünmez bir kompleks oluşturur. EDTA magnezyum dahil farklı metallere bağlanabilen kelatlayıcı bir bileşendir. Magnezyum DNAaz enziminin kofaktörüdür. Mg ve EDTA bağlanması ile var olan DNAaz’ın aktivitesi azalır. Tris/HCl pH’yı tamponlama kapasitesine sahip bir çözeltidir (düşük veya yüksek pH DNA’ya zarar verir). Nükleik asitler saflaştırmanın bu aşamasında kolayca degrade olabildiği için örneğin homojenizasyonu ve CTAB tampon çözeltisinin eklenmesi arasındaki zamanın en aza indirilmesi önemli bir noktadır. Hücre ve organel membranları (mitokondri ve kloroplast gibi) parçalandıktan sonra DNA pürifikasyonu gerçekleştirilir.



Şekil 2.16. Hücre membranının parçalanması ve genomik DNA’nın ekstrasyonu

Ekstraksiyon: Bu aşamada polisakkaritler, fenolik bileşikler, proteinler ve sıvı çözeltide bulunan diğer hücre lizatları, CTAB nükleik asit kompleksinden ayrılır. Çok sayıda enzimatik reaksiyonu inhibe etme yetenekleri nedeniyle

fenolik bileşiklerin olduğu gibi polisakkaritlerin de yok edilmesi özellikle önemlidir. Düşük tuz konsantrasyonlarında (0,5 M NaCl), nükleik asit kompleksi kontaminantları çökmez ve solüsyonun kloroform ile ekstraksiyonu sırasında uzaklaştırılabilir. Kloroform proteinleri denatüre eder ve sıvı ile organik fazların ayrılmasını kolaylaştırır. Normal olarak, sıvı faz formu üstteki fazdır. Ancak, sıvı faz tuz konsantrasyonu nedeniyle yoğun ise alt fazı oluşturacaktır. Buna ek olarak, sıvı çözeltinin pH'sı 7,8-8,0 değerlerine yeteri kadar denkleştirilmemiş ise nükleik asitler organik faza dağılacaktır. Gerektiğinde sıvı fazdaki kirleticileri tamamen ortadan kaldırabilmek için kloroform ekstraksiyonu iki veya üç kez uygulanır. Nükleik asitleri en iyi şekilde geri kazanabilmek için organik faz geri özütlenerek bir önceki ekstrakta eklenebilir. Nükleik asit kompleksi bir kez saflaştırıldığında, prosedürün son aşaması olan presipitasyon gerçekleştirilebilir.

Presipitasyon: Son aşamada, nükleik asitler deterjandan ayrılır. Bu amaçla, ilk olarak sıvı solusyon yüksek konsantrasyonlu NaCl (0,8 M NaCl) ve CTAB karışımından oluşan bir presipitasyon çözeltisi ile muamele edilir. Tuz nükleik asit presipitatı oluşumu için gereklidir. Sodyum asetat tamponlama kapasitesi nedeniyle NaCl yerine tercih edilebilir. Bu koşullar altında, alkol içerisinde suda olduğundan daha çözünür olan deterjanlar, nükleik asitler presipite olurken yıkanıp atılabilirler. Takip eden %70 alkol ile muamele, nükleik asitlerin geri kalan tuzdan arındırılarak ek bir saflaştırma yapılmasını sağlar.

2.3.10.2 Spektrofotometre ile DNA miktar tayini

DNA, RNA, oligonükleotidler ve hatta mononükleotidler seyreltilmiş veya seyreltilmemiş sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığı altında (aynı zamanda görünür dalga boylarında) sahip oldukları absorbsiyon A (optik yoğunluk, OD) üzerinden direkt olarak ölçülebilir. Örnek saf olduğunda (örneğin proteinler, fenol veya agaroz gibi kontaminantlar çok düşük miktarda mevcut yahut yoksa) nükleotid bazları tarafından absorbe olan ultraviyole radyasyonun miktarı spektrofotometrik olarak basit ve doğru biçimde ölçülebilir. Bu yöntem için, düşük iyon konsantrasyonlu sıvı tamponlar (örneğin TE tamponu) idealdir. Nüklek asitlerin konsantrasyonu genellikle bir köre (boş örnek) karşı 260 nm'de A ölçülerek belirlenir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler 280 nm'de absorbladığı için A260/A280 oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1,8, saf RNA ise yaklaşık 2,0 değerini vermelidir. 230 nm'de görülen absorpsiyon, örneğin karbonhidratlar,

peptitler, fenoller veya aromatik bileşenler gibi maddelerle kontaminasyonunu gösterir. Saf örneklerde A260/A230 oranı yaklaşık 2,2 olmalıdır.

2.3.10.3 GDO tarama analizi

GDO tarama analizlerinde sıklıkla 35S ve FMV promotor, NOS terminatör bölgeleri taranmaktadır. Bunun için geliştirilmiş diziye özgü primer ve problar yada piyasada ticari olarak mevcut GDO tarama analizi kitleri kullanılabilir. Bu bölgelerden herhangi birinin pozitif çıkması durumunda GDO Tarama analizi "Tespit edildi" olarak raporlanır.

2.3.10.4 Tip belirleme (Gen Tanımlama) analizleri

GDO Tarama analizi pozitif olan örneklerde öncelikle bitki spesifik analizleri yapılarak içeriğinde, soya, mısır, pamuk, kanola, şeker pancarı gibi bileşenler tanımlanır. Sonrasında tespit edilen türe ait olası genler gene özgü olarak sentezlenen primer problar veya ticari kitler ile belirlenir.

2.3.10.5 Miktar analizleri

Onaylı gen bölgelerini etiketlemesi için GDO'lu DNA için ve toplam bitki DNA'sı için standart eğrileri oluşturmak amacıyla kantitatif standartlara ihtiyaç vardır. DNA bazlı metotlar için referans materyal; analiti içeren materyal, analiti içeren toz halde materyal, analiti içeren materyalden ekstrakte edilen DNA ya da spesifik analite ait nükleotid dizisini içeren plazmit olabilir (Chaouachi et al., 2013).

EC 641/2004 direktifinde referans materyallerin geliştirilmesi, üretimi ve homojenite, stabilite, depolama sertifikalandırma bilgileri gibi diğer gereklilikler açıklanmaktadır. Önceleri plazmidler referans materyal olarak kullanılabilmekteydi, kullanıcının plazmidin ya da plazmide aktarılan amplikon DNA dizisinin istenen amaca uygunluğunun, metodun tam olarak plazmide aktarılan DNA dizisini hedeflediğini sağladığından emin olması gerekmektedir.

Referans materyal ve örneklerle ilgili dikkat çekilmesi gereken bir diğer nokta da biyolojik faktörlerdir. Bitkilerle çalışırken, zigotluk, doku kromozom sayısı GDO bitkinin ebeveyn orjini gibi faktörler GDO miktarının belirlenmesinde önemli etkileri olan faktörlerdir. Uluslararası ticaret ürünlerdeki GDO miktarının

belirlenmesinde güvenilir analiz yöntemleri gerektirir. GDO'ların varlığı % olarak belirlenmesi gerekmektedir, fakat birimler belirtilmemiştir.

Avrupa Birliği'nde EC 1830/2003 direktifi eşik değeri için birim belirtmemektedir. 2004'de EC direktifi 2004/787/EC " Haploid genomda genetik modifiye DNA kopya sayısının hedef takson- spesifik DNA kopya sayısına oranı" şeklinde belirtilmesini tavsiye etmektedir. Yasal düzenlemelerdeki ve GDO tespit yöntemleri arasındaki uyum eksikliği Holst-Jensen ve arkadaşları (2006) tarafından belirtilmektedir. GDO miktar sonuçlarının GDO kütle oranı ya da GDO kopya sayısı oranı şeklinde verilebilmesi için farklı tipte (kalibrant) standart maddelere ihtiyaç vardır. Kütle/kütle olarak ölçeklendirilerek hazırlanan GDO ve aynı türün GDO olmayan kısmına oranı olarak sertifikalandırılan CRM'ler test için kullanılacaksa sonuçların kütlece verilmesi önerilmektedir.

PCR ve (q) PCR'ı kullanan laboratuvarlar sadece hedef DNA kopya sayısını ölçebilirler. Kopya sayısı (q) PCR kullanılarak CRM dilüsyon serisinde ölçülür ve bu değerler örneklerde kopya sayısını belirlemek için kullanılan kalibrasyon eğrisini çizmek için kullanılır. Her ne kadar bazen CRM'lerin kütle/kütle ölçeklendirmesinden bağıl kopya sayısının dönüştürülmesi (örneğin; zigotluk, doku kromozom sayısı, GDO'nun ebeveyn orjini, materyalden DNA'nın ekstrakte edilebilirliği gibi) ile ilgili yeterli bilgi olsa da analiz edilen örneklerin bileşimi ile ilgili bilgi yetersizdir (Chaouachi et al., 2013).

Göreceli (relatif) miktar ölçümü

Bir örneğin GDO içeriği, ürünün toplam miktarında genetik değişikliğe uğramış materyalin miktarı ile ifade edilebilir. Bu değeri gerçek zamanlı PCR'ye dayalı bir sistemde saptamak için endojen (iç) referans genin DNA sekans kopya sayısının ve GDO spesifik hedef DNA sekans kopya sayısının ölçülmesi gerekir (normalleştirme için). Referans olarak seçilen gen bitki türüne özel, haploid genom başına tek bir kopya, aynı türün farklı hatlarında değişmeden kalan ve analiz edilen GDO gibi amplifiye olabilecek özellikte (bu da çok iyi bir primer-prob dizaynına bağlıdır) şekilde seçilmiş olması gerekmektedir. Göreceli ölçümde karşılaşılabilecek problemlerden biri kurallarda belirtilmeyen bir GDO içeriğinin yüzde olarak ortaya çıkmasıdır. Bu yüzden GDO içeriği (yüzde olarak) saf içeriğin toplam ağırlığı üzerinden modifiye edilmiş içeriğin ağırlığı olarak düşünülebilir (örneğin, bir örnekte bulunan soyanın toplam ağırlığı üzerinden GDO soyanın ağırlığı). Analitik bakış açısından düşünüldüğünde GDO yüzdesini

hedef sınıfa özel sekans başına hedef DNA sekansı olarak ölçmek uygundur. Bu tanım GDO hatlarının bazı önemli özelliklerini dikkate almaz ve bu yüzden sonuçların yorumlanmasında şu parametreler göz önünde tutulmalıdır:

a. Vakanın politiği. GDO vakası doğal çeşitten farklı bir politiğe sahip olabilir (örneğin, diploit yerine tetraploid)

b. Vakanın zigositesi. GD özelliği homozigot veya heterozigot olabilir.

c. Tek bir gen kasetinin haploid genom başına düşen insersiyon sayısı. Bir gen kaseti haploid genom başına tek bir kopya veya daha fazla kopya olarak ilave edilebilir.

Madde c, primer-prob sistemini, gen kasetinin genoma eklenme sınırlarının kapsayacak biçimde tasarlayarak aşılabilir. Sınır sekansları özgün olduğu için sistem hem vaka–spesifik olacak, hem de aynı gen kasetinin birden fazla kopyasının genoma eklenmiş olduğu durumlarda bunun miktar tayininde fazladan ölçülmesinin önüne geçilecektir. a ve b maddeleri örnek ile homojen olan referans materyallerin kullanımıyla deneysel olarak aşılabilir (örneğin soya unu referans materyalinin soya ununu ölçmek için kullanılması). Sertifikalı referans materyallerinden farklı olan miktar ölçümü standartları (örneğin klonlanmış DNA sekansları veya genomik DNA karışımları), ölçümdeki moleküler farklılıkları düzeltmek için sertifikalı referans materyallere karşı kontrol edilebilir. a ve b maddeleriyle ilgili problemleri çözmede yaygın olarak kullanılan yöntem GDO yüzdesini haploid genomlar olarak ifade etmektir.

Tespit limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) parametreleri ölçülen kopyaların gerçek sayısından etkilendiği için ölçümün bu özelliği her durumda bir metot geliştirilirken dikkate alınmalıdır.

Bir eş zamanlı PCR analizinin planı şunları içermelidir:

• GDO-spesifik hedef DNA sekansını belirlemek için tasarlanan bir PCR sistemi,

• Türe özgü GD göreceli derişimlerinin hesaplanmasında “normalleştirici” olarak da kullanılan endojen referans gen sekansını belirlemek için tasarlanmış ikinci bir PCR sistemi,

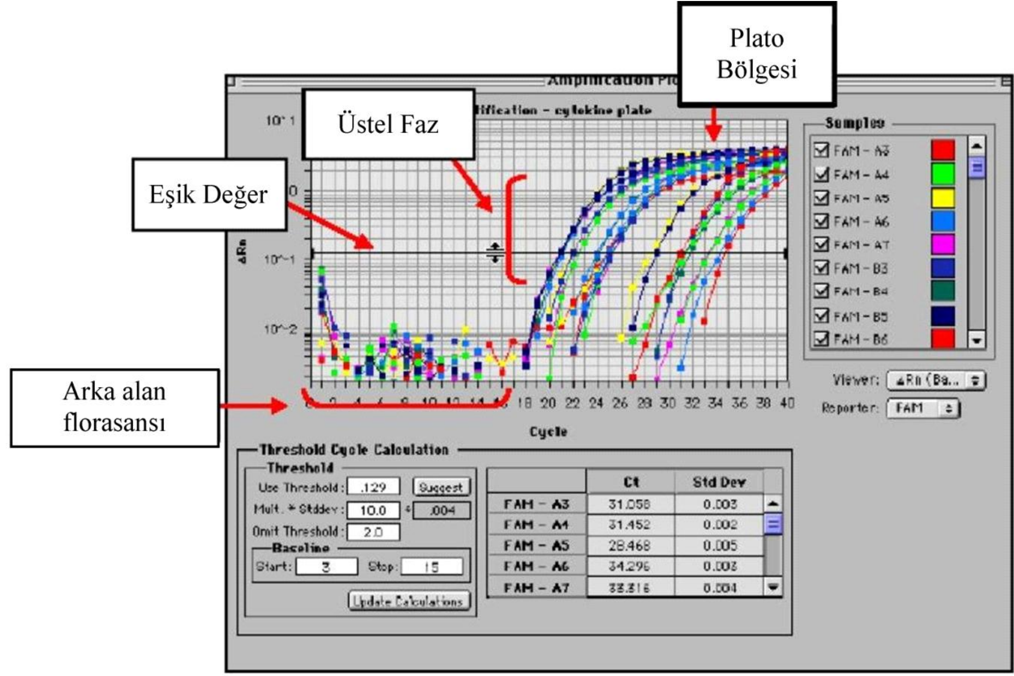
• Hem hedef hem de endojen referans sekansları için standart eğriler. Her deney örneği için hedef ve endojen referansın miktarı uygun standart eğriler ile belirlenir. Hedefin miktarı, endojen referansın miktarı ile normalleştirilerek göreceli derişim elde edilir. İstatistiksel gereklilikleri karşılamak için standart eğriler en az 4 farklı derişim noktası içermelidir. Standart eğrinin her noktası ve örnek en az üç farklı kez yüklenmelidir.

Buna ek olarak her analiz hem referans gen, hem de GDO ölçümleri için negatif bir kontrol (NTC-hedef içermeyen kontrol) içermelidir. Negatif DNA hedef kontrolü, pozitif DNA hedef kontrolü de ayrıca yapılabilir.

Farklı deneyler arasındaki olası istatistiksel sapmaları önlemek için referans gen ölçümü ve GDO spesifik sekans ölçümü farklı değil aynı PCR çalışmasında (koamplifikasyon) gerçekleştirilmelidir (Weighardt et al., 2006).

Eş zamanlı PCR verinin grafik analizi

Eş zamanlı PCR uygulanırken florasan veri (Rn biriminde), döngü sayısına (veya zamana) karşı sinyal miktarını bulmak için bir grafikle toplanır. Genellikle bu grafik, yarı-logaritmik bir ölçekte oluşturulur. Gerçek zamanlı PCR'da üç farklı aşama görmek mümkündür: arka plandaki sinyalle ilgili hafif dalgalanmalarının olduğu ilk " lag" aşaması; artan paralel verilerin bulunduğu ikinci logaritmik aşama (üstel faz) ve verilerin platoya ulaştığı üçüncü aşama (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Bir gerçek zamanlı PCR grafiği. Gerçek zamanlı bir PCR'in tipik aşamaları işaretlenmiştir.

Gerçek zamanlı PCR'in gücü, nicel ölçümün PCR reaksiyonunun son aşamasında (plato) değil de amplifiye olmuş DNA miktarının (Rn degerinde) giderek artan (üstel faz) gelişiminin arka plandaki sinyalden çok daha yüksek olduğu bir noktada miktar ölçümünün gerçekleşmesidir. Bu ölçme yöntemi, örneğin başlangıçtaki miktarı ile amplifikasyonun ilerlediği aşama arasında direkt bir ilişki olduğu için miktar ölçümünün doğruluğunu arttırır. Gerçek zamanlı PCR'da eşik döngüsü (CT) deneysel olarak florasan sinyalinin üçüncü ve onbeşinci döngüsü ile on standart sapma arasında ölçülen florasan sinyallerinin ortalamasına ulaştığı döngü olarak tanımlanır. Başlangıçtaki genomik DNA miktarı ne kadar yüksek olursa PCR sürecinde biriken ürün o kadar hızlı tespit edilir ve CT değeri o kadar düşük olur. Uygulamada CT değerini belirleyen eşik çizgisinin seçimi genellikle çalışana kalmış bir seçimdir ve bu da gerçek zamanlı PCR'in kişisel öğelerinden biridir. Eşik çizgisi herhangi bir arka plan aktivitesinin ilerisinde, üstel artış aşamasına dek gelen, logaritmik gösterimde lineer görülen bir bölgede seçilmelidir. Her durumda eşik çizgisi tekrarlanan (3lü) analizleri temsil eden paralel grafiklerinin çakışmaya başladığı seviyelere yerleştirilmelidir. Kimi zaman logaritmik aşamanın en başında kopyalar hafif sapma gösterebilir, bu zamanla azalır veya reaksiyon devam ederken tamamen yok olur.

GDO içeriğinin hesaplanması

Eş zamanlı PCR çıktısı, Rn+ (tüm parçaları içeren florasan sinyali) ve Rn- (reaksiyonun arka plandaki sinyali, başlangıç ya da bir NTC örneğinin sinyali) arasındaki fark olarak hesaplanabilen ΔRn'dir.

Bir örneğin GDO içeriği iki farklı yolla belirlenebilir:

Farklı miktarlardaki DNA'ya dayalı iki standart eğri çizilir: Referans genine özgü bir ölçüm sistemi içeren ilk eğri GD hedefe özgü bir ölçüm sistemi içeren ikinci eğri.

Her örnek için hedef ve referans gen miktarı, standart eğriyle ara değer bulunarak (interpolasyon) belirlenir. Daha sonra GDO DNA içeriği (yüzde olarak), GD hedef sekans miktarı ve referans gen sekans miktarının oranı olarak hesaplanır (GD/referans x 100)(Kaur et al., 2010).

Analizdeki örneklerin iki standart eğrinin ara değerlerinin içine düşmesi gerektiğine dikkat edilmelidir. Bunların dışına çıkan değerler, ölçüm hataları ihtimaline karşı hariç tutulmalıdır.

2. Karşılaştırmalı CT yöntemi (ΔΔCT): Bu yöntemde bilinen miktarda standartlar kullanılmaz; GDO hedef sekansının göreceli miktarı ile referans gen sekansı karşılaştırılır. Standart eğri, bilinen farklı konsantrasyonlardaki GDO (örneğin IRMM'den sertifikalı referans materyalleri) içeriğine sahip bir dizi örnek yüklenerek elde edilir.

Sonuç ΔΔCT (ΔCT=CT referans gen - CT GDO gen) standart eğrisidir. GDO içeriğinin değeri bir örnek için ΔCT değeri hesaplanıp sonucu standartlardan alınan değerlerle karşılaştırarak elde edilir.

Bu yöntemin başarılı olabilmesi için hem hedefin, hem de referans PCR sistemlerinin amplifikasyon verimleri benzer olmalıdır. Bunu kontrol edebilmek için kullanılan hassas bir yöntem ΔCT'nin (aynı başlangıç miktarı için iki ayrı PCR'in CT değerleri arasındaki fark) örnekler seyreltildiğinde nasıl değiştiğine bakmaktır. İki amplikonun verimlilikleri eşit ise log girdi miktarının CT'ye karşı çizilen grafiği yatay bir çizgi olacaktır (<0,10 eğimli). Bunun anlamı iki PCR'in da ilk örnek miktarı kadar bir alanda eşit şekilde verimli olduklarıdır. Eğer eşit

olmayan bir verim görülürse standart eğri yöntemi GDO ölçümü için kullanılmalıdır. Dinamik alan, sonuçların doğru olduğu, hedeflerin minimum ve maksimum konsantrasyonları için belirlenmelidir. Konvansiyonel karşılaştırmalı RT-PCR'da dinamik alan hedef-rakip oranı yaklaşık 10:1-1:10 olarak sınırlandırılır (en doğru sonuç 1:1 oranında sağlanır). Eş zamanlı PCR çok daha geniş bir dinamik alana ulaşabilmektedir (Weighardt et al., 2006; Chaouachi et al., 2013).

2.4 Gıdalara Uygulanan İşlemlerin DNA Hasarı ve GDO Miktar Analizlerine Etkisi

Mekanik etkiler, yüksek sıcaklık, pH değişiklikleri, enzimatik aktivite ve fermentasyon gibi aşamaların bir veya birkaçı gıdaların işlenmesinde sıklıkla uygulanan proseslerdir. Bu prosesler DNA'nın hidroliz, oksidasyon ve deaminasyon gibi etkilerle degredasyonuna sebep olmaktadır (Gryson, 2010). Bu da DNA bazlı analizlerde gerek DNA izolasyon aşamasında gerekse de PCR amplifikasyonunda zorluk yaratmaktadır. Bu sebeple işlenmiş gıdalarda etkin bir DNA izolasyonu ve geçerli bir metotla PCR amplifikasyonu çok önemlidir. Çünkü bu iki aşama da GDO'nun tespitini ve miktarının belirlenmesinde analizin uygulanabilirliğini, doğruluğunu, hassasiyetini, LOD ve LOQ'yu etkiler.

2.4.1 Sıcaklık

Yüksek sıcaklık DNA degredasyonu için en bilinen etkidir ve bu nedenle araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Isıl işlemler DNA'nın fiziksel degredasyonuna (denatürasyon) sebep olmaktadır. DNA'nın yüksek sıcaklıkta bozunması depurinasyon ve deaminasyona dayanır. 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda belirgin bir ayrılma ve ikincil yapıda geri dönüşümsüz kayıplar görülür (Lindahl, 1993; Gryson, 2010). Sterilizasyon sıcaklığı (121°C'de 15 dk) gibi normal sıcaklıklar PCR için mevcut DNA'nın tamamını parçalamaz(Lipp et.al., 1999). Pişirme, kurutma ve kavurma gibi işlemler DNA degredasyonuna neden olur. DNA kısa fragmentlere kırılır ve PCR hassasiyeti düşer (Gryson, 2010).

2.4.1.1 <u>Kurutma</u>

70°C' gibi düşük sıcaklıkta bile patates cipslerinin 2 saat kurutulmasında DNA'nın hasar gördüğü belirtilmektedir (Bauer et al., 2004). Daha yüksek

sıcaklıklarda daha kısa sürede DNA'nın degrede olduğu gözlenmiştir. Mısır tanelerinin 94°C 5 dk ısıtılması ile DNA'nın hasar gördüğü ve 577 bp amplikonun tamamen yok olduğu belirtilmektedir (Gryson, 2010). Islak öğütülen gluten fraksiyonları ve tahıl tanelerinin 135°C'de 2 saat kurutulması DNA'da ciddi hasara neden olmuştur.

2.4.1.2 <u>Pişirme</u>

Isıl işlemde suyun etkisi Murray et al. (2009) tarafından 100°C'de 60 dk ısıl işlem gören kuru ve yaş soya fasulyesi yemlerinde karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Kuru örneklerde mevcut kalıp DNA miktarında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, yaş örneklerde DNA (830 bp ve 1022 bp) miktarında azalma gözlenmiştir. DNA çözeltilerini farklı sıcaklık ve sürelerde ısıtmak DNA fragmentasyonuna etkilerini gözlemlemek için en kolay yoldur. Hupfer et al. (2000) 95°C'de 60 dk ısıl işlemin ortalama DNA fragment uzunluğunu 600 bp'nin altına düşürdüğünü göstermişlerdir. Debode et al. (2007) DNA solüsyonunu 99°C'de 7 saat ısıtma bloğunda ısıtmaya rağmen ortalama DNA boyutunun hala 400 bp olduğunu gözlemlemişlerdir. Kaynatma sıcaklığının DNA hasarına etkisi soya sütü üretim prosesinde çalışılmıştır. Soya sütü prosesinde; soya fasülyeleri geceden ıslatılır, öğütülür ve süzülür. Süzüntü kaynatılarak soya sütü elde edilir. Kharazmi et al. (2003) DNA hasarının ıslatılmış soya fasülyelerinin öğütülmesi sırasında mekanik etkiler nedeniyle oldukça fazla olduğunu belirtmektedir. Ancak yine de 100°C'de 10-20 dk ısıl işlemin etkisinin yanında mekanik etkilerin DNA hasarına etkisinin daha az olduğunu belirtmektedirler (Chen et al., 2007).

2.4.1.3 <u>Sterilizasyon</u>

Gıdaların 121°C'de otoklavlanması sulu pişirmeye göre DNA hasarı üzerinde daha etkilidir. Ogasawara et al. (2003) soya fasülyelerinin 121°C'de 15 dk otoklavlanması ile 295 bp'de kısa DNA fragmentlerini tespit edebilmiştir. Real- time PCR'da otoklavlama işlemi C_T değerinde artışa neden olmaktadır, 120°C'de 60 dk ısıl işlemde 8,5 döngü artış gözlenmiştir(Debode et al., 2007). Sterilizasyon işleminde uygulanan yüksek basınç DNA hasarına neden olmaktadır (Ogasawaraet al., 2003; Chen et al., 2007). Forbes et al. (1998) 30 saniye ile 20 dk arasında uygulanan yüksek basınçlı buharın (>100°C, >1 bar) çok şiddetli DNA hasarına yol açarken, 10 dk uygulanan düşük basınçlı buharın (85°C, <0.5 bar) kısmi DNA hasarına yol açtığını göstermiştir. Ekstrüzyon işlemi sırasında yüksek basınç ve yüksek sıcaklık uygulanır. 170°C'de ekstrüzyonun DNA hasarı üzerine

açık bir etkisi bulunmaktadır ki 68 bp'lik DNA fragmentinin Real- time PCR'ile amplifikasyonu mümkün olamamıştır (Murray et al., 2007; Gryson, 2010)

2.4.1.4 Fırında pişirme

200, 220, ve 230°C'de farklı pişirme denemeleri ekstrakte edilen DNA'nın boyutunu belirgin ölçüde düşürdüğünü göstermiştir (Tilley, 2004; Gryson et al., 2007; Gryson et al, 2008; Hrncirova et al., 2008). Ekmek örneklerinde örnekleme önemli olabilmektedir. Üst kabuk kısmı konveksiyon yolu ile direk ısıya maruz kalmaktadır, bu da daha şiddetli bir ısıtmaya neden olmaktadır, alt kabuk ise tavada kondüksiyon yolu ile ısı transferine maruz kalmaktadır. Ayrıca ekmeğin merkezinde kabuğun hemen altına göre yüksek nem içeriği nedeni ile daha büyük DNA hasarı oluşmaktadır. Ayrıca pişirme sırasında ekmeğin mikro yapısı değiştiğinden mevcut DNA'nın ektrakte edilebilirliği de değişebilir (Gryson, 2010).

2.4.1.5 Kızartma

Patates cipsi ve gevreği üretiminde, sırasıyla 175°C'de 3 dk ve 150°C'de 1 dk ısıl işlemleri uygulanır, bitki DNA'sı ciddi zarar görür ve son üründe sadece 96 bp'lik DNA fragmentleri amplifiye olabildiği görülmüştür (Bauer et al., 2003). Buna karşın dilimlenmiş 175°C'de kızartılmış tofuda daha az hasar görülmüştür ki 595 bp'lik amplifikasyon elde edilebilmiştir (Ogasawara et al., 2003). Quirasco et al. (2004) ıslak masayı (Uzakdoğu'da tüketilen soya ürünü) yağda kızartma ve fırında kurutmayı karşılaştırmıştır. Kızartılan örnekten ekstrakte edilen DNA'nın daha az hasar gördüğünü belirtmişlerdir. Bunun sebebini ortamdaki suyun kızartmanın termal etkisini tamponlayarak kırmış olabileceği ile açıklamışlardır.

2.4.2 pH

2.4.2.1 Düşük pH

Pek çok gıda, örneğin meyve ve sebzeler asidik pH ile karakterize edilir ya da asidik pH'ya maruz kalır (Hupfer et al., 1998). Asidik pH DNA'nın depürinasyonu nedeni ile zincirde açılmalara neden olur (Sambrook and Russel, 2001; Gryson, 2010). Domates suyu pH 4,5'de 65°C'de soya unu da pH 4.75 ve 65°C'de olduğu gibi asitle katalizlenen reaksiyonlar ısıl işlemle daha da hızlanır. pH' ya bağlı DNA bozulması ekmek hamurunun kabarması sırasında da

gözlenmiştir (Bauer et al., 2003; Hupfer et al., 1998). Mısırın yaş öğütülmesinin, öğütme için tanelerin hafif asidik suda bekletilmesinin DNA hasarı üzerine tek başına öğütmeden daha fazla etkileri olduğu düşünülmektedir. Hücre duvarı DNA'yı koruduğu için pH'nın etkisi sınırlıdır (Smith and Maxwell, 2007). Düşük pH'da uzun süren inkübasyon sonrasında kalıp DNA'nın mevcut olması başlangıçtaki hücre lizizi ve ilk DNA bozunmasından sonra, DNA degredasyonundan sorumlu endojen nükleaz enzimlerinin DNA'nın kendisinden daha hızlı bozunduğu ve ileri bir bozunmanın böylelikle engellendiğini düşündürmektedir. İlaveten asidik durumda DNA tek zincir haline geçer ki bu da PCR reaksiyonu için yeterli bir substrattır. pH 3 gibi kuvvetli asidik pH'larda DNA depürinasyonu gerçekleşir ve zincirde aralanmalar görülür ve bu da PCR hassasiyetini düşürür(Gryson, 2010).

2.4.2.2 Yüksek pH

DNA alkali pH'da nispeten daha stabildir. pH 8,5-9,5 aralığında DNA'nın çift sarmalı birbirinden ayrılır (Hupfer et al., 1998). Yüksek alkali solüsyonlar mısırdan tortilla yapımının ilk aşamalarında kullanılmaktadır. Mısır lapasını alkali ile kaynatma (pH 11.0) sırasında pH ve sıcaklığın birlikte etkisi sonucu DNA hasarına özel ilgi gösterilmiştir. Alkali ile pişirilmiş mısır, Meksika'da yaygın olan tortilla, mısır cipsi, tako, tamales gibi gıdaların üretiminde kullanılan ara üründür (Quirasco et al., 2004). Kharazmi et al., (2003) mısırın pH 9.0 'da 60 dk. kaynatılması ile 585 bp'den büyük fragmentlerin amplifikasyonunun gerçekleşemediğini belirtirken Hupfer et al. (1998) 1914 bp'lik DNA fragmentlerini tespit edebilmişlerdir. Quirasco et al., (2004) %0,1'lik StarLink mısırın alkali pişirilmesinden sonra, pişirme sırasında genomik DNA'daki hasara rağmen Real- time PCR ile %0,1'lik mısırı tespit ve kantite edebilmişlerdir. Soya protein izolatlarının üretim aşamasında da yüksek ve düşük pH'nın birlikte etkileri bulunmaktadır. Öğütülmüş soya fasulyelerinin alkali ile lizizinden sonra , çözünen kısımlar uzaklaştırılır ve proteinler düşük pH'da çöktürülür. Çoğunlukla da sonrasında sprey kurutma uygulanır(Bauer et al., 2003). Protein izolatlarında farklı uzunluklardaki DNA fragmentleri, bazı durumlarda 1000 bp'ne kadar fragmentler amplifiye olur (Meyer and Candrian, 1996; Bauer et al, 2003; Brod and Arisi, 2007; Gryson et al., 2008).

2.4.3 Fermentasyon

Pan and Shih (2003) misonun 120 gün fermentasyonu ile transgenik bileşenlerin azaldığını ve 35S promotorunun tespit edilemediğini göstermişlerdir. Misonun fermentasyonunun tamamlanması ile (5-6 ay sonra), DNA fragmentlerinin çoğu 200 bp'nin altına iner (Pan and Shih, 2003; Jeng et al., 2003). Fakat misoda klasik PCR ve nested PCR ile 95 bp'lik amplikon tespit edilememiştir (Ogasawara et al., 2003; Jeng et al., 2003). Fermentasyon sırasındaki bu güçlü DNA hasarının mikroorganizmalar tarafından üretilen DNAz enzimleri nedeniyle olabileceği düşünülmektedir (Ogasawara et al., 2003). Benzer zorluklar fermente tofu ürünü olan sufu üretiminde de görülmektedir. Pozitif amplifikasyon olabilmesi için nested PCR kullanılmak zorunda kalınmıştır (Vijayakumar et al., 2009). Bununla birlikte fermente soya ürünü (fermente edilmiş soya fasulyesi) olan natto ve soya sosu genomik DNA'sı fermentasyon sırasında hasar görmektedir(Ogasawara et al, 2003; Kakihara et al., 2007).

2.5 GDO'ların Potansiyel Riskleri

GDO'lu ürünlerin yaygınlaşması ile birlikte, bu ürünlerin çevre, ekosistem ve insan sağlığı üzerinde zararları olduğu yönünde görüş ileri süren gruplardan bazıları bitki ve hayvanlardaki genetik mühendisliğinin her şekline tamamen karşı olup, GDO'ların yasaklanması konusunda oldukça kesin hükümlere sahiptirler. Diğer bir kesim ise bu ürünlerin insan ve çevre sağlığına olası olumsuz etkileri nedeniyle, üretim ve ticaretinin sıkı bir şekilde denetlenmesi gerektiğini ifade etmektedirler. Özellikle Avrupa Birliği ülkelerindeki muhalifler GDO'ların dünya tarımını, sağlığını ve ekolojisini tehdit edeceğini düşündüklerinden bu gıdaları "frankeştayn gıdalar" olarak nitelendirmektedirler. Nitekim bu alanda gerçekleştirilen bazı deneysel çalışmalar GDO'lu ürünlerin kullanımı ile doğal çevrede olumsuz etkiler olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalarda elde edilen bulgular ışığında GDO'lu ürünlerin çevre ve doğaya olumsuz etkileri aşağıda sıralanmıştır(Çelik ve Turgut-Balık, 2007).

- Gen Kaçışı, Yabani Tozlaşma Yapay Gen Transferi ve Hibritleşme

- Süper Yabani Türlerin Ortaya Çıkması

- Bitkilerde Dayanıklılığın Gerilemesi

• Zararlılarda Dayanıklığın Artması

• Genetik Kirlenme Riski

• Organizmaların Genom Yapısındaki Etkileşimden Doğabilecek Riskler

•GDO Genlerinin Toprak ve Su Ekosisteme Geçişinin Doğurabileceği Riskler

• Biyoçeşitliliğe Etkileri

• İnsan ve Hayvan Sağlığında Meydana Gelebilecek Riskler.

2.5.1 İnsan sağlığı üzerine etkisi

1. Toksik etkiler: GDO'lar, bünyelerinde böcek öldürücü genler ile terminatör teknolojisi gereği aktarılmış olan genleri içerirler. Bu genleri içeren bitkilerde toksik madde sürekli olarak üretildiğinden, bunlara "pestisit üreten bitkiler" adı verilmektedir. Bu toksinlerin dokularda birikmesi önemli riskler oluşturmaktadır. L-tryptophan isimli çok bilinen bir maddenin genetik mühendisliği uygulanmış bir tipi 1989 yılında 37 Amerikalı'nın ölümüne ve 5000 kişinin bir kan hastalığına yakalanmasına (Eosinophilia Myalgia Syndrome "EMS") neden olmuştur (Haspolat, 2012). Yapılan çalışmalarda GDO'lu ürünlerin kısırlık ve sakat doğum riskini artırdığına yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu alanda Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu tarafından 2007 yılında gerçekleştirilen araştırmada, GDO'lu soya ile beslenen dişi farelerden doğan bebek farelerin diğerlerine göre daha küçük oldukları ve büyük bir kısmının üç hafta içerisinde öldükleri tespit edilmiştir. İskoçya Rowett Enstitüsü'nden Dr. Arpad Rusztai'nin GDO'lu patates ile beslediği farelerin tümünün iç organlarında küçülme, sindirim sistemlerinde bozukluk, bağışıklık sistemlerinde çökme, kan yapılarında bozulma ve mide çeperlerinde kalınlaşma görülmüştür. Laboratuvar testlerinde snowdrop (kar damlası) çiçeğinin DNA'sı ile bilinen bir viral promoter olan Cauliflower Mosaic Virus (CaMv) kullanılarak genetik yapısı değiştirilmiş patateslerin memeliler için zehirli olduğu tesbit edilmiştir. Kimyasal kompozisyonu normal patateslerden oldukça farklı olan bu patatesler farelerin hayati önemi olan organlarına ve bağışıklık sistemlerine zarar vermiştir. En tehlikelisi ise; farelerde gastrik bir viral enfeksiyon ortaya çıkmış olup, bunun da nedeninin CaMv denilen

viral promotor olduğu yönünde kuvvetli deliller vardır. Bu promotor GDO'larda yaygın olarak kullanılmaktadır (Haspolat, 2012).

2. Kanser riski: GDO'ların doğrudan ve dolaylı olarak kanserojen etkisinin olabileceği çeşitli araştırıcılar tarafından belirtilmektedir. Özellikle, herbisitlere dayanıklılığı sağlayan pamuk, soya, mısır ve kolza çeşitlerinde kullanılan "bromoxynil" ve "glufonsinate" gibi kimyasal maddelerin doğrudan kanser yapıcı oldukları bilinmektedir. FDA (Gıda ve İlaç Dairesi), 1994 yılında bir firmanın büyüme hormonu satmasını ve süt veren ineklere bu hormonun enjekte edilmesini bilim insanlarının tüm itirazlarına rağmen onaylamıştır. Bu ineklerin sütünden elde edilen besinleri tüketen insanlarda meme, prostat ve kolon kanseri riskini %400- 500 oranında artırdığı tespit edilmiştir.

3. Allerji: Gıda allerjisi olan kişiler günlük besin maddelerine eklenen yabancı proteinlerden zarar görebilirler. Nitekim, 1996 yılında, Brezilya kestanesinden soya fasulyesine aktarılan "2S" genini içeren ürünler, alerji yapması nedeniyle marketlerden toplatılmıştır. Bu besin maddelerinin etiketlerine gerekli uyarıların yazılması besin allerjisi olan kişileri korumak açısından gereklidir. Ancak, FDA veya dünyadaki diğer kontrol mekanizmaları pazarlama öncesi hayvan ve insanlarda testler yapılmasını rutin olarak zorunlu kılmamaktadır.

4. Antibiyotik direnci: Gen aktarımında, seleksiyon amacıyla aktarılan özelliklerden biri antibiyotik direncidir. Gen aktarımından sonra transgenik hücre ve dokular bu antibiyotikleri içeren ortamlarda kültüre alınırlar. Antibiyotik bulunan ortamda yaşayabilen hücrelerin aktarılmış olduğuna hükmedilir. Ancak, bu antibiyotik direncinin insan ve hayvan bünyesindeki bakterilere yatay olarak geçişiyle sağlık açısından risklerin ortaya çıkması söz konusudur (Haspolat, 2012).

2.6 Soya

Ülkemizdeki gıda sektöründe soya ürünleri tüketim alışkanlığı yeni başlamıştır. Ülkemizde tüketilen soya ağırlıklı olarak hayvan beslenmesinde kullanılmaktadır. Soya fasulyesi üretiminin en yüksek olduğu ABD ve gelişmiş ülkelerde, soya fasulyesi ve ürünleri ilavesiyle elde edilen süt, yoğurt, peynir, et eşdeğeri, dondurma, dondurma külahı, pasta, kahve, yağ, margarin, soya unu, ekmek, makarna, çocuk maması, hayvan yemi, yeşil gübre, plastik maddeler vb. ürünler bu bitkinin ne kadar önemli ve ne kadar çeşitli alanlarda

kullanılabildiğinin en açık göstergesidir. Yüksek kaliteli protein içeriği ve baklagiller içinde kolay sindirilen ürün olma özelliği nedeniyle soya fasulyesi çok çeşitli kullanım alanları bulunan bitkisel bir gıda maddesidir.

Dünyada toplam soya ekim alanı 99 milyon ha civarında olup bunun yaklaşık %92'si 8 ülkede (ABD 31,0 milyon ha, Brezilya 21,0 milyon ha, Arjantin 16,0 milyon ha, Hindistan 9,6 milyon ha, Çin 9,0 milyon ha, Paraguay 2,5 milyon ha, Kanada 1,4 milyon ha, Bolivya 1,0 milyon ha) bulunmaktadır. Dünya toplam soya üretimi 222,2 milyon ton ve verim 224 kg/da civarındadır. 2011 yılında ülkemizdeki ekim alanı 26.421 ha, üretim 102,26 bin ton olup verim yaklaşık 387 kg/da civarındadır.

Ülkemiz soya ve soya ürünlerinin nerede ise tamamını bugün için ithal etmek durumundadır. Bu ürünlere duyulan ihtiyaç, kanatlı yem üretiminin artışı oranında artmaktadır (Anon.,2014).

2.6.1 MON 40-3-2 (Round-up Ready Soya) özellikleri

Soya hattı GTS 40-3-2 Monsanto Canada Şti. tarafından soya üretiminde zararlı bitkilerle mücadelede alternatif bir sistem olarak glufosatın kullanımına olanak sağlamak için geliştirilmiştir. GTS 40-3-2 nin geliştirilmesi, Agrobacterium tumefaciens suşu CP4'den izole edilen glufosat dirençli 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enzimini kodlayan genin, ticari soya çeşidi (Asgrow Tohum Şirketi) A5403'e aktarılması yolu ile olmuştur.

Glufosat toleransı

Roundup®'ın aktif molekülü olan Glufosat, sistemik, seçici olmayan zararlı ot kontrol maddesi olarak dünya çapında kullanılan bir herbisittir. Glufosat 5-enolpurivil-şikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS) enziminin kompetitif inhibitörü olarak görev yapar. EPSPS fenilalanin, tirosin ve triptofan aromatik aminoasitlerinin üretiminde yer alan şikimat biyokimyasal yolunda zorunlu bir enzimdir. EPSPS'in engellenmesi büyümenin durdurulması ve bitki ölümüne yol açar.

Aktarılan Glufosat tolerans geni bu enzimin bakteri kökenli (*Agrobacterium tumefaciens* CP4 suşundan) versiyonudur. Bitki, mantar ve mikroorganizmalarda bulunan bu enzim glufosata yüksek derecede dirençlidir. Bu nedenle inhibisyona

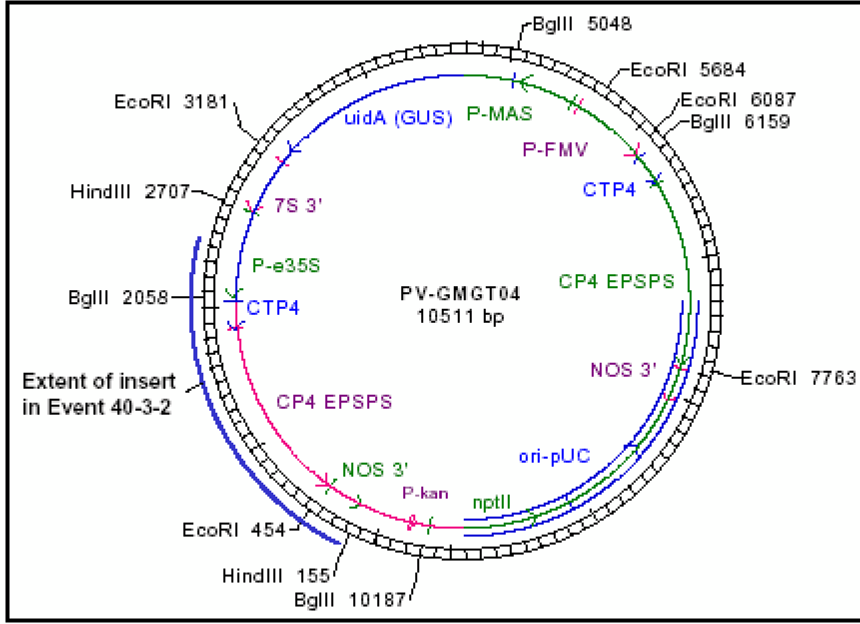
uğramaz ve bitkinin aromatik amino asit metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilir. EPSPS enzimi şikimat-3-fosfat ve fosfoenolpiruvat (PEP) arasındaki reaksiyonu katalize eder. 5-enolpiruvil-şikimat-3-fosfat (EPSP) ile fosfat bu reaksiyonun ürünleridir. EPSP, aromatik aminoasit sentezinde gerekli bir ara moleküldür. Bu biyokimyasal yolun glufosat tarafından engellenmesi, protein sentezini engelleyerek bitki ölümüne yol açar. EPSPS, glufosatın bitkideki tek hedef enzimidir ve PEP kullanan diğer enzimler glufosattan etkilenmezler.

EPSPS geni kuvvetli bir konstitütif promotör olan karnıbahar mozaik virüsü (P- CaMVE35S) ve A. tumefaciens kaynaklı nopalin sentaz terminatörü (T-nos) ile kontrol edilmektedir. Bitki kökenli, kloroplast transit peptidi (Petunia hibrida'dan CTP4) kodlayan DNA sekansı glufosat tolerans geninin 5' ucuna klonlanmıştır. EPSPS genine birleştirilen sinyal peptidi yeni sentezlenen enzimin şikimat yolunun bulunduğu ve glufosatın etkisini gösterdiği kloroplastlara geçişini sağlar. Geçiş gerçekleştikten sonra, transit peptidi özel bir proteaz ile enzimden ayrılır ve hızlı bir şekilde parçalanır.

EPSPS sentaz doğada yaygın olarak bulunur ve toksik ve allerjik olması beklenmez. Toksik ve allerjik polipeptidlerin sekans data bazlarında karşılaştırma analizleri yapıldığında bilinen herhangi bir toksin yada alerjenin aminoasit sekansı ile önemli bir homoloji göstermemiştir(Querchi et al., 2006).

Geliştirilme Metodu

Ticari soya çeşidi A5403 (Asgrow Tohum Şirketi) altın partikül bombardıman yoluyla, *E.coli*' den elde edilen plasmid vektörü PV-GMGT04 ile transforme edilmiştir (Şekil 2.18). PV-GMGT04, glufosat toleransı kodlayan CP4 EPSPS genini, seçici markör olarak β-glukoronidaz üretimi için gus genini, ve antibiyotik direnci için nptII genini (kanamisin direnci) içermektedir. Seçilen ilk transformantta biri gus seçici markörü, diğeri glufosat tolerans geni ile olmak üzere iki integrasyon bölgesi görülmüştür. Bu iki bölge, izleyen eşeyli üreme jenerasyonlarında bağımsız olarak ayrışmış ve analizler sonucu, hat GTS 40-3-2'de sadece glufosat tolerans genini içeren tekil bir integrasyon bölgesi bulunduğu görülmüştür(Windels et al., 2001).



Şekil 2.18. Roundup Ready® soya vaka 40-3-2 geliştirmek için kullanılan PV-GMGT04 plazmid (Monsanto, 2000)

2.6.2 A2704-12 özellikleri

Yabancı otlar, kültür bitkilerinde önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan tarımsal üretimde mücadele edilmesi gereken arzu edilmeyen bitkilerdir. Yabancı otlarla kültürel önlemler (çapalama, elle yolma vb.) ve çoğunlukla da yabancı ot öldürücü kimyasallar olan herbisitler kullanılarak mücadele edilmektedir. Bu amaçla rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak, glifosinat ve glifosat gibi geniş spektrumlu herbisitlere karşı dayanıklılık genleri kültür bitkilerine aktarılarak, herbisitlere tolerant ticari çeşitler geliştirilmiştir. Herbisite tolerant özellikteki bu çeşitlerin yetiştirildiği alanlarda herhangi bir gelişme döneminde söz konusu herbisit(ler) kullanılarak tüm yabancı otlara karşı etkin bir mücadele yapılabilmektedir.

pUC19 plazmidinden türetilmiş olan pB2/35SAcK vektörü ColE1 replikasyon orijini ve bakterilerde ampisilin direncini sağlayan bla geni içermektedir. Ek olarak plazmid vektör Agrobacterium tumefaciens TiAch5 Ti plazmidinin sağ sınır T-DNA dizisi ile bitkilerin glifosinat amonyum herbisitine karşı tolerant olmasını sağlayan Streptomyces viridochromogenes kökenli fosfinotrisin asetil-transferaz (pat) geninin ekspresyon (gen ifadesi) kasetini içermektedir. Bitkilerde yüksek oranda ekspresyon için optimize edilmiş sentetik pat geni, bu kasette karnabahar mozaik virüsüne ait 35S promotör ve 35S

terminatör bölgeleri tarafından kontrol edilmektedir. Gen aktarımı için kullanılacak olan pB2/35SAcK vektörü, son olarak bla geninin bitkilerde ekspresyonunu engellemek için PvuI restriksiyon enzimiyle (kesme enzimi) kesilmiştir. Bu kesim sonucunda (1) pat gen kaseti ve bla geninin 3´ ucu ile (2) bla geninin 5´ ucu ve sağ sınır bölgesi olmak üzere iki fragment (DNA parçası) oluşturulmuştur. Daha sonra PvuI restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan bu pB2/35SacK vektörü, partikül bombardımanı yöntemiyle soya tohumlarından elde edilen embriyonik sürgün uçlarına aktarılmıştır (EFSA, 2007).

2.6.3 MON89788 özellikleri

PV-GMGOX20 plazmidi, *Agrobacterium tumefaciens*'in T-DNA (aktarılan) bölgesinin sağ ve sol sınır dizileri içinde bitkilerde glifosat herbisitine toleransı sağlayan CP4 epsps gen ekspresyon kaseti taşımaktadır. Agrobacterium tumefaciens'in CP4 suşu kökenli, bitkilerde yüksek düzeyde ifadesi için kodonları optimize edilmiş olan aroA (epsps; 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) geni, Arabidopsis thaliana kökenli EF-1 alfa uzama faktörünü kodlayan Tsf1 gen promotörü ile bu promotöre bağlanmış figwort mozayik virüsüne ait 35S dizini (kimerik promotör) ve bezelye kökenli RuBisCo'nun alt birimini kodlayan RbcS2 geninin transkripsiyonal terminasyon ve poliadenilasyon bölgesi tarafından kontrol edilmektedir. Ayrıca bu kaset; proteinin ifadesini artırmak için Tsf1 genine ait 5'-okunmayan lider DNA baz dizilerini ve proteinin kloroplasta transferi için *A. thaliana'*ya ait EPSPS kloraplast transit peptidini kodlayan DNA baz dizilerini içermektedir. A3244 elit soya tohumlarının çimlendirilmesiyle gelişen embriyolardan kesilen meristem dokuları, yukarıda tanımlanan PV-GMGOX20 plazmidini taşıyan Agrobacterium tumefaciens ile inoküle edilerek gen aktarımı yapılmıştır (EFSA, 2008).

2.7 Roll Ekmek

Ekmek; Dünyanın her yerinde bilinen, üretimi yapılan ve en çok tüketilen gıda maddesidir. Doyurucu, ulaşılması kolay ve vücut için en ekonomik enerji kaynağıdır. Dünya Sağlık Örgütüne göre günlük enerjinin % 55-60'ının karbonhidratlı gıdalardan karşılanması gerekmektedir. Bu oranın da büyük kısmını ekmek oluşturur.

Ekmek israfını "insan beslenmesinde kullanılmayan ekmek israf edilmiş sayılır" şeklinde ifade edebiliriz. Çünkü ekmek insan gıdası olarak tüketilmek

amacıyla üretilir. Buğdaydan ekmek elde edilinceye kadar % 51 oranında girdi artışı olmaktadır. Roll ekmek, gerek ekmek israfını önlemek gerekse sunumu ile toplu tüketim yerleri, yemekhaneler için ülkemizde son dönemlerde üretimi yaygınlaşan küçük yuvarlak bir ekmek çeşididir. 50-80 g aralığında üretimi yapılmaktadır. Üretimi un, su, tuz, maya ile hamurun hazırlanması, şekil verme, fermentasyon ve pişirme aşamalarından oluşur.

Soyalı ürünler: Soya ununun farklı formları Amerika ve İngiltere'de 1930'lardan beri ekmek yapımında kullanılmaktadır.1954'te Ofelt ve Smith USDA Araştırma Laboratuvarı'nda Lisin amino asiti yönünden eksik buğday ekmeğine besin değeri yüksek, yağlı ve yağsız soya ununun katılabileceği konusunda çalışmalar yapmışlardır (Stear, 1990). Amerika'da gıda endüstrisinde soya yağı birincil öneme sahip olduğundan yağı alınmış soya unu kullanımı yaygındır ancak Avrupa ve İngiltere'de tam yağlı soya unu kullanılır. Soya unu belli oranda ekmeğe katıldığında hamurun işlenmesini kolaylaştırır, ekmeğin rengini, tekstürünü, aromasını ve dayanıklılığını iyileştirir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Kullanılan Kimyasallar:

EZ-Vision^{TM} Floresan boya (Amresco), Agaroz (Amresco), NaCl (Merck), CTAB (Sigma-Aldrich), Etanol (Merck), Na_2EDTA (Sigma), Kloroform (Sigma-Aldrich), HPLC saflıkta su (VWR), HCl (Sigma-Aldrich), İsopropanol (Merck) kullanılmıştır.

Kullanılan Rerefans Materyaller:

Validasyon çalışmalarında ve miktar analizler için çizilen kalibrasyon eğrisinde kullanılan referans materyaller;

ERM-BF 410gk (%10 Mon 40-3-2)

ERM-BF 410c (%0,5 Mon 40-3-2)

ERM-BF 410bk (%0,1 Mon 40-3-2)

AOCS 0906A (%0 Mon 89788)

AOCS 0906B (%100 Mon 89788)

AOCS 0707 A3 (%0 A2704-12)

AOCS 0707 B4 (%100 A2704-12)

Kullanılan Örnekler:

20 farklı soya unu, soyalı mantı ve bisküvi numuneleri İzmir ve İstanbul'dan rasgele temin edilmiştir. Bu örneklerde CTAB, Qiagen Mericon ve Eurofins Gene Spin protokollerine göre DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Eurofins Gene Scan ile GDO tarama analizleri yapılmış pozitif çıkan numunlerde CRL yöntemleri ile GDO tanımlama ve miktar analizleri gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Cihazlar:

- **Analitik terazi:** Sartorius marka analitik terazi (111222AC24) tüm tartım işlemlerinde kullanılmıştır.

- **Etüv:** Thermo Scientific marka etüv ekmek pişirme denemeleri için kullanılmıştır.

- **Mikro Santrifüj:** Eppendorf marka mikro santrifüj cihazı (5430) tüm örneklerin DNA izolasyonu aşamasında kullanılmıştır.

- **Vorteks Karıştırıcı:** Boeco marka vorteks karıştırıcı örneklerin DNA izolasyonu aşamasında kullanılmıştır.

- **Buzdolabı:** Referans materyallerin saklanması için Arçelik marka buzdolabı kullanılmıştır.

- **Real-Time PCR:** GDO Tarama analizleri, Gen tanımlama ve miktar analizleri için Stratagene Mx3000P marka real- time PCR cihazı kullanılmıştır.

- **Nonodrop/Spektrofotometre:** İzole edilen tüm DNA'ların konsantrasyon ve saflığını ölçmek için Thermo Scientific NanoDrop 2000c marka spektrofotometre kullanılmıştır.

- **Yatay Elektroforez:** Bisküvi, soyalı mantı ve soya unu numunerinde DNA'ların görüntülenerek karşılaştırılması amacıyla Thermo marka yatay elektroforez kullanılmıştır.

- **Jel görüntüleme Cihazı:** Viber Lourmat – Infinity marka jel görüntüleme cihazı agaroz jelde yürütülen DNA'ların fotoğraflarının çekilerek görüntülenmesinde kullanılmıştır.

- **Isıtıcı Blok (Thermo Shaker):** Nosheng MS 100 marka ısıtıcı ve çalkalayıcı blok tüm örneklerin DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

- **Biyogüvenlik Kabini:** Euroclone Bioair Safemate 1.2 marka biyogüvenlik kabini Real- Time PCR için master miks hazırlanmasında kullanılmıştır.

Nüve MN 090 marka biyogüvenlik kabini misklere DNA ilave edilmesi aşamasında kullanılmıştır.

- **Derin dondurucu:** Sanyo marka derin dondurucu izole edilen DNA'ların saklanmasında, Heier marka derin dondurucu kitler, primer probların saklanmasında kullanılmıştır.

- **Mikropipetler:** 1000 µl, 100 µl, 10 µl'lik Eppendorf ve HTL Discover marka mikropipetler DNA izolasyonu ve Real Time PCR için hazırlık aşamalarında kullanılmıştır.

- **Combi Spin:** BioSan marka spin Real- Time PCR için örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır.

- **Plate Santrifüj:** Eppendorf marka plate santrifüj Real- time PCR için plate konulan misklerin karıştırılması amacıyla kullanılmıştır.

3.2 Metot

Soyalı mantı, soya unu ve bisküvi numunerinde CTAB, Qiagen Mericon ve Eurofins Gene Spin protokollerine göre DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Eurofins Gene Scan ile GDO tarama analizleri yapılmış pozitif çıkan numunlerde CRL yöntemleri ile GDO tanımlama ve miktar analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 DNA izolasyonu

20'şer adet soyalı mantı, soya unu ve bisküvi numunelerinden DNA izolasyonları CTAB, Qiagen Mericon ve Eurofins Gene Spin protokollerine göre yapılmıştır. İzole edilen tüm DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.1.1 CTAB (Cetyltrimetilamonyum Bromür) yöntemi

200 mg öğütülmüş homojen örnek materyali 1,5 ml'lik mikrosantrifuj tüpüne tartılır. 300 µl steril deiyonize su eklenir ve karıştırılır. 500 µl CTAB tampon çözeltisi (20 gr/l CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris – HCl, 20 mM Na_2EDTA) eklenir ve karışıtırılır. 20 µl Proteinaz K (20 mg/ml) eklenir, karıştırılır ve 65^{o}C'de 1 gece (15 saat) inkubasyona bırakılır. 20 µl Rnase A (10 mg/ml) eklenir, karıştırılır ve 65^{o}C'de 30 dakika inkubasyona bırakılır. Tüp 20

dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Süzüntü, içerisinde 500 µl kloroform bulunan 1,5 ml’lik mikrosantrifuj tüpüne aktarılır ve 30 saniye vortekslenerek çalkalanır. Tüp 10 dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Faz ayrımı olduktan sonra 500 µl üst katman içerisinde 500 µl kloroform bulunan 1,5 ml’lik yeni mikrosantrifuj tüpüne aktarılır ve 30 saniye çalkalanır. Tüp 10 dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Üst katman içerisinde 1,5 ml’lik yeni mikrosantrifuj tüpüne aktarılır ve üzerine 2 hacim CTAB çökeltme çözeltisi (5 g/l CTAB, 0,04 M NaCl) eklenir, pipetleme ile karıştırılır. Oda sıcaklığında 60 dakika inkubasyona bırakılır. Tüp 14000 devir/dk’da 5 dakika santrifuj edilir. Süzüntü dökülür. Çökelti 350 µl 1,2 M NaCl çözeltisi içinde çözülür. Üzerine 350 µl kloroform eklenir ve 30 saniye çalkalanır. Tüp 10 dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Üzerine 0,6 hacim isopropanol(-20°C) eklenir ve tüp alt üst edilerek çalkalanır. Tüp 10 dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Süzüntü dökülür. Çökeltinin üzerine 500 µl %70’lik etanol eklenir ve dikkatlice sallanır. Tüp 10 dakika 14000 devir/dk’da santrifuj edilir. Süzüntü dikkatlice dökülür. Çökelti kurutulduktan sonra 100 µl steril deiyonize su içerisinde çözülür.

3.2.1.2 QIAGEN-Mericon Food izolasyon yöntemi

Dneasy Mericon food Kit protokolü, CTAB ekstraksyon protokolünden modifiye edilmiş ticari bir kittir. Homojenize edilmiş 200 mg örnek üzerine l ml Lysis buffer ve 2,5 µl Proteinaz K solusyonu ilave edilip, vorteks yapılır. 15 saat (1 gece) 65 °C'da 1000 devir/dk'da thermoshakerde bekletilir. İşlem sonunda, mikrotüpler buzda oda sıcaklığına (15-25 °C'a) soğutulur. Örnekler 15 dk 14000 rpm'de santrifüj edilerek, supernetanttan 700 µl alınarak, üzerine 500 µl kloroform eklenip, vorteks yapılır. 14000 devir/dk'da 20 dk santrifüj sonrası, 250 µl supernetant üzerine 1000 µl PB (bağlama) solusyonu eklenip, vorteks yapılır. Karışım spin kolonlara aktarılıp, 14000 devir/dk'da 1 dk santrifüj edilir. Kolonlar 500 µl AW2 yıkama solüsyonu ile yıkanır. 14000 devir/dk'da 2 dk santrifüj edilerek kurutulur. Elüsyon sıvısından 100 µl eklenerek, oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakılır. 14000 devir/dk’da 1 dk santrifüj edilerek DNA filtreden alınır(Dneasy Mericon Food Handbook, 2010).

Bu yöntem bisküvi numunelerine aynen uygulanırken, daha iyi sonuç alabilmek için mantı numunelerine liziz aşamasından sonra 20 µl RNAz enzimi ilavesi, soya unu numunelerine 1400 µl Lysis, 3,5 µl Proteinaz K ve 25 µl RNaz enzimi ilavesi şeklinde modifiye edilmiştir.

3.2.1.3 <u>Eurofins GeneSpin izolasyon yöntemi</u>

Örnekler iyice homojenize edildikten sonra herbir örnekten 2 paralel olarak mikrotüplere 200 mg tartım yapılır. Tartılan örneklerin üzerine önceden 65 °C'a ısıtılmış 550 µl Lysis buffer ilave edilir. Vortekste karıştırılan tüplere 10 µl Proteinaz K enzimi ilave edilir. Örneklerin bulunduğu tüpler vorteskte karıştırılarak 1 gece (15 saat) dk 65 °C'de 1000 devir/dk hızda inkübe edilir. İnkübasyon sonrası örneklere 20 µl RNase enzimi ilave edilerek vorteks yapılır ve oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. Örnekler 14000 devir/dk' da 20 dk santrifüj edilir.

Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak üzerine aynı miktarda C4 buffer ve etanol (%96'lık) ilave edilerek vortekste iyice karıştırılır. Karıştırılan örnekler önceden hazırlanmış filtrelere aktarılıp, 12000 devir/dk'da 1 dk santrifüj edilir. Bu aşamada DNA selüloz filtreye tutunduğundan filtrat atılarak filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirilir. Filtrelere 400 µl CQW tamponu ilave edilerek tüpler 12000 devir/dk'de 1 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası filtreler yeni toplama tüplerine yerleştirilerek üzerine 700 µl C5 solusyou ilave edilir. 12000 devir/dk'da 1 dk santrifüj sonrası filtrat atılarak filtrelere 200 µl C5 solusyou ilave edilir. Tüpler maksimum hızda 2 dk santrifüj edildikten sonra filtreler yeni tüplere aktarılır. Filtrelere önceden 70 °C'a ısıtılmış elüsyon sıvısından 100 µl ilave edilerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra tüpler mikrosantrifüjde 12000 devir/dk'da 1 dk santrifüj edilerek DNA elde edilir (Eurofins GeneSpin Catalogue, 2011).

Bu yöntem bisküvi ve mantı numunelerine aynen uygulanmıştır, daha iyi sonuç alabilmek için soya unu numunelerine 1000 µl Lysis, 15 µl Proteinaz K ve 25 µl RNaz ilave edilerek modifiye edilmiştir.

3.2.2 DNA saflık ve konsantrasyonunun tespiti

Nüklek asitlerin konsantrasyonu genellikle bir köre (boş örnek) karşı 260 nm'de A ölçülerek belirlenir. Kontaminantların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilebilir. Proteinler ışığı maksimum 280 nm'de absorbladığı için A260/A280 oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1,8, saf RNA ise yaklaşık 2,0 değerini vermelidir. İzole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu ve DNA'nın saflığı Thermoscientific Nanodrop 2000c cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. DNA'nın saflığı için A (260/280) değeri ölçülmüştür. Saf bir DNA'da A(260/280) oranı 1,80 ile 2,00 arasında; 1,8'in

altında elde edilen A(260/280) değeri protein kontaminasyonunu, 2,00'nin üzerinde elde edilen A(260/280) değeri de RNA kontaminasyonunu işaret etmektedir. Örneklerin DNA konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre ng/µl olarak hesaplanır. OD260 260 nm dalga boyunda örneğe ait optik densiteyi, 50 ise çift zincirli DNA'nın 260 nm'de absorbansı olarak kabul edilen sabit bir değerdir (Somma et al., 2004).

DNA Konsantrasyonu = OD260 × 50 × Seyreltme faktörü

3.2.3 Agaroz jel elektroforezi

Ekstakte edilen DNA'lar büyüklük, saflık ve hasarı görüntülemek amacıyla agaroz jel elektoroforezinde yürütülmüştür. Bu amaçla 5 µl DNA 1 µl EZ-Vision^{TM} floresans boya ile boyanmıştır. Boyanan DNA'lar 125 mA ve 100 V'da 1X TAE tamponu ile hazırlanan %1'lik agaroz jelde 120 dk yürütülmüştür.1 kb ladder (Fermentas GeneRuler$_{TM}$) kullanılmıştır. DNA bantlarını görüntülemek için jel UV transillüminatör cihazında (Viber Lourmat) fotoğraf çekilerek görüntülenmiştir.

3.2.4 GDO Tarama Analizi

GDO Tarama analizleri Eurofins Gene Scan GMO Kit Protokolu'ne göre gerçekleştirilmiştir. 35S ve FMV Promotor, NOS Terminator bölgeleri taranmıştır. 1 reaksiyon için 12, 5 µl basic mix ve 7,5 µl oligo mix birleştirilerek master mix oluşturulur. Üzerine 5 µl DNA konur. Çizelge 3.2'deki termal döngüde Real- time PCR çalıştırılır.

Çizelge 3.1. GDO Tarama analizi için önerilen plate yerleşimi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PTC		NTC		N 1A	N 1B						
B	PTC		NTC		N 2A	N 2B						
C	CRM		EK									
D	CRM		ÇK									
E												
F												
G												
H												

Analiz sonuçlarının değerlendirilebilmesi için öncelikle sistemin değerlendirilmesi gerekmektedir. İki paralel pozitif kontrollerin ikisinin de 35S, NOS, FVM, IPC (Internal pozirif kontrol) yönünden pozitif, NTC, EK, ÇK' de sadece IPC'de amplifikasyon görülmelidir. CRM olarak 35S, NOS, FMV bölgelerinin üçünü de içeren MON98034gen bölgesi kullanılmaktadır. CRM'lerde de tüm bölgelerde pozitif amplifikasyon görülmelidir. Bu aşamadan sonra örnekler değerlendirilebilir.

Çizelge 3.2. GDO Tarama Analizi Termal Profil

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
2	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	90	Evet	

3.2.5 Gen Tanımlama (ident) Analizleri

Soyaya ait MON 40-3-2, A2704-12, MON89788 bölgelerinin gen tanımlama analizleri Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından validasyonu yapılan ve yayımlanan (CRL) yöntemlerine göre yapılmıştır.

3.2.5.1 Mon 40-3-2 tip belirleme analizi

Çalışılacak örnek ve CRM DNA'larının konsantrasyonları 50 ng/µl'ye ayarlanmıştır. MON 40-3-2 için Master Miks hazırlanır. MON 40-3-2'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. MON 40-3-2 Sistemi için master miksin hazırlanması (Anon., 2009)

Komponent	**Son Konsantrasyon**	**µl /reaksiyon**
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
MON 40-3-2-F (10 µM)	150 nM	0,75
MON 40-3-2-R (10 µM)	150 nM	0,75
MON 40-3-2-P (5 µM)	50 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		19
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Hazırlanan master miksten her kuyucuğa 46 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 4 µl DNA eklenir. Çizelge 3.4'deki şekilde plate yerleşimi yapılır. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır.

Çizelge 3.4. Örnek Plate Set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CRM		NTC		N 1A	N 1B						
B	CRM		NTC		N 2A	N 2B						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla 2 adet Negatif Kontrol (NTC), 2 paralel sertifikalı referans numune (MON 40-3-2 için CRM) çalışılmaktadır.

Plate'e mixin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profil Çizelge 3.5' de gösterilmiştir (Anon, 2007a; Anon., 2009).

Çizelge 3.5. Mon 40-3-2 Sistemi için termal profil

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	55	60	Evet	

Analizin sonucunu değerlendirilebilmesi için; CRM'de amplifikasyonunun görülmesi gerekmektedir. Negatif kontrolde herhangi bir amplifikasyonunun olmaması gerekmektedir. Çalışılan örnekte amplifikasyon görülmesi durumunda sonuç "Tespit Edildi" şeklinde değerlendirilir ve MON 40-3-2 miktar analizine geçilir. Amplifikasyon eğrisinin görülmemesi durumunda analiz sonucu "Tespit Edilmedi" olarak değerlendirilir.

3.2.5.2 A2704-12 tanımlama analizi

Çalışılacak örnek DNA'larının konsantrasyonları 40 ng/µl'ye ayarlanır. A 2704-12 için Master Miks hazırlanır. A 2704-12'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.6'da gösterilmiştir (Anon., 2007b).

Çizelge 3.6. A 2704-12 Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	Son Konsantrasyon	µl /reaksiyon
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	12,5
KVM 175 F (10 µM)	400 nM	1
SM 001 R (10 µM)	400 nM	1
TM 031 P (10 µM)	200 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		5
DNA (Max 200 ng)		5,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		25

Hazırlanan master miksten her kuyucuğa 20 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 5 µl DNA eklenir. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır. Çizelge 3.7'daki plate yerleşim düzeni önerilmektedir.

Çizelge 3.7. Çalışılması önerilen Plate set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CRM		NTC		N 1A	N 1B						
B	CRM		NTC		N 2A	N 2B						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla 2 adet Negatif Kontrol (NTC), 2 paralel sertifikalı referans numune (A 2704-12 için CRM) çalışılmaktadır.

Plate'e mixin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profil Çizelge 3.8' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. A2704-12 Sistemi için Termal Profil

	Aşama		**Sıcaklık (ºC)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	60	Evet	

Analizin sonucunun değerlendirilebilmesi için; CRM'de amplifikasyonun görülmesi gerekmektedir. Negatif kontrolde herhangi bir amplifikasyonun olmaması gerekmektedir. Çalışılan örnekte amplifikasyon görülmesi durumunda sonuç "Tespit Edildi" şeklinde değerlendirilir, ve A 2704-12 miktar analizine geçilir. Amplifikasyon eğrisinin görülmemesi durumunda analiz sonucu "Tespit Edilmedi" olarak değerlendirilir (Anon, 2007c).

3.2.5.3 Mon 89788 tip belirleme analizi

Çalışılacak örnek ve CRM DNA'larının konsantrasyonları 50 ng/µl'ye ayarlanır. MON 89788 için Master Miks hazırlanır. MON 89788'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.9'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.9. MON 89788 Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	**Son Konsantrasyon**	**µl /reaksiyon**
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
MON 89788-F (10 µM)	150 nM	0,75
MON 89788-R (10 µM)	150 nM	0,75
MON 89788-P (5 µM)	50 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		19
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Hazırlanan master miksten her kuyucuğa 46 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 4 µl DNA eklenir. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır. Çizelge 3.10'teki plate yerleşim düzeni önerilmektedir.

Çizelge 3.10. Çalışılması önerilen Plate set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CRM		NTC		N 1A	N 1B						
B	CRM		NTC		N 2A	N 2B						
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla 2 adet Negatif Kontrol (NTC), 2 paralel sertifikalı referans numune (MON 89788 için CRM) çalışılmaktadır. Plate'e miksin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profil Çizelge 3.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11. Mon 89788 Bölgesi için Termal Profil

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	60	Evet	

Analizin sonucunun değerlendirilebilmesi için; CRM'de amplifikasyonun görülmesi gerekmektedir. Negatif kontrolde herhangi bir amplifikasyonun olmaması gerekmektedir. Çalışılan örnekte amplifikasyon görülmesi durumunda sonuç "Tespit Edildi" şeklinde değerlendirilir ve MON 89788 miktar analizine geçilir. Amplifikasyon eğrisinin görülmemesi durumunda analiz sonucu "Tespit Edilmedi" olarak değerlendirilir.

3.2.6 GDO miktar analizleri

Tip analiz sonucu pozitif çıkan örneklerde hangi bölge pozitif ise o gen bölgesi için miktar analizi yapılır. Miktar analizleri de CRL yöntemlerine yöre yapılmıştır.

3.2.6.1 Mon 40-3-2 miktar analizi

Çalışılacak örnek ve CRM DNA'larının konsantrasyonları 50 ng/µl'ye ayarlanır. Kalibrasyon eğrisi 5 noktalı seri dilüsyon şeklinde çizilir. S1, %10 oranında MON 40-3-2 bölgesini içermektedir. S2 ve S3 1/4 oranında, S4 ve S5 1/3 oranında DNase/RNase free su ile seyreltilir. Kalibrasyon eğrisine ait teorik kopya sayıları Çizelge 3.12'de görülmektedir(Anon., 2009).

Çizelge 3.12. Kalibrasyon eğrisinin kopya sayıları

	S1	**S2**	**S3**	**S4**	**S5**
DNA Miktarı (ng/4 µl)	200	50	12,5	4,2	1,4
Soya genom kopya sayısı	176991	44248	11062	3687	1229
MON 40-3-2 Kopya sayısı	17699	4425	1106	369	123

Lektin ve MON 40-3-2 için Master Miksler hazırlanır. Lektine ait Master Miksin hazırlanması Çizelge 3.13'de, MON 40-3-2'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.13. Lektin Referans Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	**Son Konsantrasyon**	**µl /reaksiyon**
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
Lec F (10 µM)	150 nM	0,75
Lec R (10 µM)	150 nM	0,75
Lec P (10 µM)	50 nM	0,25
Distile Su (DNase/RNase Free)		19,25
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Çizelge 3.14. MON 40-3-2 Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	Son Konsantrasyon	µl /reaksiyon
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
MON 40-3-2-F (10 µM)	150 nM	0,75
MON 40-3-2-R (10 µM)	150 nM	0,75
MON 40-3-2-P (5 µM)	50 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		19
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Hazırlanan master mikslerden her kuyucuğa 46 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 4 µl DNA eklenir.

Lectin referans sisteminin ve MON 40-3-2 sisteminin termal profilleri farklı olduğu için, ayrı runlarda çalışılır. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır. Çizelge 3.15 ve 3.16'teki plate yerleşim düzeni önerilmektedir.

Çizelge 3.15. Çalışılması önerilen Plate set-up (Lektin için)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lec S1	Lec S1	Lec S1	Lec S2	Lec S2	Lec S2	Lec S3	Lec S3	Lec S3			Lec NTC
B	Lec S4	Lec S4	Lec S4	Lec S5	Lec S5	Lec S5	Crm	Crm	Crm			
C	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
D	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B
E												
F												
G												
H												

Çizelge 3.16. Çalışılması önerilen Plate set-up (MON 40-3-2 sistemi için)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40-3-2 S1	40-3-2 S1	40-3-2 S1	40-3-2 S2	40-3-2 S2	40-3-2 S2	40-3-2 S3	40-3-2 S3	40-3-2 S3			40-3-2 NTC
B	40-3-2 S4	40-3-2 S4	40-3-2 S4	40-3-2 S5	40-3-2 S5	40-3-2 S5	Crm	Crm	Crm			
C	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
D	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B
E												
F												
G												
H												

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla her 2 sistem için 1 adet Negatif Kontrol (NTC), 3 paralel sertifikalı referans numune (MON 40-3-2 için CRM) çalışılmaktadır. Kalibrasyon eğrisi ve örnekler en az 2 paralel olarak çalışılır. Plate'e mixin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. Her 2 sitem için de FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profiller Çizelge 3.17 ve 3.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. Termal Profil (lektin sistemi için)

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	60	Evet	

Çizelge 3.18. Termal Profil (MON 40-3-2 sistemi için)

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	55	60	Evet	

MON 40-3-2 miktar analizinde örneklerin değerlendirilmesine geçmeden önce, sistemin değerlendirilmesi gerekmektedir. Sistemin değerlendirilebilmesi için aşağıdaki tüm kriterlerin sağlanması gerekmektedir.

- Her 2 sisteme ait kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin [-3,1 ve -3,6] aralığında olması gerekmektedir.

- Her 2 sisteme ait kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının 0,98'den büyük olması gerekmektedir.

- Örneklerin 2 paraleli arasındaki RSD değeri hem lektin hem de MON 40-3-2 sitemi için ≤ %25 olmalıdır. Ayrıca her örneğe ait analiz sonucunun (MON 40-3-2 kopya sayısı/Lektin kopya sayısı) paralelleri arasındaki RSD değeri yine ≤ %25 olması gerekmektedir (Anon., 2007a).

Yukarıdaki tüm kriterler sağlanıyorsa; örneğe ait (MON 40-3-2 kopya sayısı/lektin kopya sayısı/)*100 formülünden MON 40-3-2 % miktarı hesaplanır.

3.2.6.2 A2704-12 miktar analizi

Çalışılacak örnek DNA'larının konsantrasyonları 40 ng/µl'ye ayarlanır. %0 ve %100'lük DNA'lar %3,6, %1 ve %0,045 oranları elde edilecek şekilde karıştırılmıştır. %3,6 GDO'lu CRM kalibrasyon eğrisinde S1 olarak kullanılmıştır. %3,6'lık S1'den %0'lık CRM kullanılarak, seri dilüsyonla kalibrasyon eğrisindeki %1,8, %0,9, %0,45 ve %0,09 seviyeleri elde edilmiştir. (Anon., 2007b).

Çizelge 3.19. Kalibrasyon eğrisinin % GDO Değerleri

	S1	S2	S3	S4	S5
DNA Miktarı (ng/5 µl)	200	200	200	200	200
% A2704-12 DNA/DNA	3,6	1,8	0,9	0,45	0,09

Lektin ve A 2704-12 için Master Miksler hazırlanır. Lektine ait Master Miksin hazırlanması Çizelge 3.20'da, A 2704-12'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.21'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.20. Lektin Referans Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	Son Konsantrasyon	µl /reaksiyon
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	12,5
KVM 164 F(10 µM)	200 nM	0,5
KVM 165 R (10 µM)	200 nM	0,5
TM 021 P (10 µM)	200 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		6
DNA (Max 200 ng)		5,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		25

Çizelge 3.21. A 2704-12 Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	Son Konsantrasyon	µl /reaksiyon
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	12,5
KVM 175 F (10 µM)	400 nM	1
SMO 001 R(10 µM)	400 nM	1
TM 031 P(10 µM)	200 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		5
DNA (Max 200 ng)		5,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		25

Hazırlanan master mikslerden her kuyucuğa 20 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 5 µl DNA eklenir. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır. Çizelge 3.22'deki plate yerleşim düzeni önerilmektedir.

Çizelge 3.22. Çalışılması önerilen Plate set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lec S1	Lec S1	Lec S1	Lec S2	Lec S2	Lec S2	Lec S3	Lec S3	Lec S3			Lec NTC
B	Lec S4	Lec S4	Lec S4	Lec S5	Lec S5	Lec S5	Crm	Crm	Crm			
C	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
D	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B
E	A2704 S1	A2704 S1	A2704 S1	A2704 S2	A2704 S2	A2704 S2	A2704 S3	A2704 S3	A2704 S3			A2704 NTC
F	A2704 S4	A2704 S4	A2704 S4	A2704 S5	A2704 S5	A2704 S5	Crm	Crm	Crm			
G	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
H	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla her 2 sistem için 1 adet Negatif Kontrol (NTC), 3 paralel sertifikalı referans numune (A 2704-12 için CRM) çalışılmaktadır. Kalibrasyon eğrisi ve örnekler en az 2 paralel olarak çalışılır. Plate'e miksin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. Her 2 sitem için de FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profil Çizelge 3.23' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.23. Termal Profil

	Aşama		**Sıcaklık (ºC)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	60	Evet	

A 2704-12 miktar analizinde örneklerin değerlendirilmesine geçmeden önce, sistemin değerlendirilmesi gerekmektedir. Sistemin değerlendirilebilmesi için aşağıdaki tüm kriterlerin sağlanması gerekmektedir (Anon., 2007c).

- Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğiminin [-3,1 ve -3,6] aralığında olması gerekmektedir.

- Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısının 0,98'den büyük olması gerekmektedir.

- Örneklerin 2 paraleli arasındaki RSD değeri hem lektin hem de A 2704-12 sitemi için $\leq$ %25 olmalıdır.

Yukarıdaki tüm kriterler sağlanıyorsa; ΔCt yöntemi ile A 2704-12 % miktarı hesaplanır.

3.2.6.3 MON 89788 miktar analizi

Çalışılacak örnek ve CRM DNA'larının konsantrasyonları 50 ng/µl'ye ayarlanır. Kalibrasyon eğrisi 5 noktalı seri dilüsyon şeklinde çizilir. S1, 50 ng/µl'ye ayarlanan %0'lık ve %100'lük CRM'lerin %10 oranında MON 89788 bölgesini içerecek şekilde karıştırılması ile hazırlanır. S2 ve S3 1/4 oranında, S4

ve S5 1/3 oranında DNase/RNase free su ile seyreltilir. Kalibrasyon eğrisine ait kopya sayıları Çizelge 3.24'de görülmektedir (Anon., 2008b).

Çizelge 3.24. Kalibrasyon eğrisinin kopya sayıları

	S1	S2	S3	S4	S5
DNA Miktarı (ng/4 µl)	200	50	12,5	4,2	1,4
Soya genom kopya sayısı	176991	44248	11062	3687	1229
MON 89788 Kopya sayısı	17699	4425	1106	369	123

Lektin ve MON 89788 için Master Miksler hazırlanır. Lektine ait Master Miksin hazırlanması Çizelge 3.25'de, MON 89788'e ait master miksin hazırlanması Çizelge 3.26'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.25. Lektin Referans Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	**Son Konsantrasyon**	**µl /reaksiyon**
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
Lec F (10 µM)	150 nM	0,75
Lec R (10 µM)	150 nM	0,75
Lec P (5 µM)	50 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		19
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Çizelge 3.26. MON 89788 Sistemi için master miksin hazırlanması

Komponent	**Son Konsantrasyon**	**µl /reaksiyon**
Tagman Universal Master Mix (2X)	1X	25
MON 89788-F (10 µM)	150 nM	0,75
MON 89788-R (10 µM)	150 nM	0,75
MON 89788-P (5 µM)	50 nM	0,50
Distile Su (DNase/RNase Free)		19
DNA (Max 200 ng)		4,0
Toplam Reaksiyon Hacmi		50

Hazırlanan master mikslerden her kuyucuğa 46 µl dağıtıldıktan sonra, üzerine 4 µl DNA eklenir. Hazırlanan plate optik kapakla kapatılır. Çizelge 3.27'deki plate yerleşim düzeni önerilmektedir.

Çizelge 3.27. Çalışılması önerilen Plate set-up

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lec S1	Lec S1	Lec S1	Lec S2	Lec S2	Lec S2	Lec S3	Lec S3	Lec S3			Lec NTC
B	Lec S4	Lec S4	Lec S4	Lec S5	Lec S5	Lec S5	Crm	Crm	Crm			
C	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
D	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B
E	89788 S1	89788 S1	89788 S1	89788 S2	89788 S2	89788 S2	89788 S3	89788 S3	89788 S3			89788 NTC
F	89788 S4	89788 S4	89788 S4	89788 S5	89788 S5	89788 S5	Crm	Crm	Crm			
G	N 1A	N 1A	N 1A	N 1B	N 1B	N 1B	N 2A	N 2A	N 2A	N 2B	N 2B	N 2B
H	N 3A	N 3A	N 3A	N 3B	N 3B	N 3B	N 4A	N 4A	N 4A	N 4B	N 4B	N 4B

Her PCR çalışmasında; çalışmanın doğruluğunu gözlemek amacıyla her 2 sistem için 1 adet Negatif Kontrol (NTC), 3 paralel sertifikalı referans numune (MON 89788 için CRM) çalışılmaktadır. Kalibrasyon eğrisi ve örnekler en az 2 paralel olarak çalışılır.

Plate'e miksin yerleştirildiği şekilde bilgisayarda plate kurulumu hazırlanır. Her 2 sistem için de FAM boyası seçilir ve çalışmada kullanılacak termal profil hazırlanır. Termal profil Çizelge 3.28' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.28. Termal Profil

	Aşama		**Sıcaklık (°C)**	**Süre (s)**	**Veri Toplama**	**Döngü**
1			50	120	-	1
2	Başlangıç Denatürasyonu		95	600	-	1
3	Amplifikasyon	Denatürasyon	95	15	-	45
		Bağlanma ve Uzama	60	60	Evet	

MON 89788 miktar analizinde örneklerin değerlendirilmesine geçmeden önce, sistemin değerlendirilmesi gerekmektedir. Sistemin değerlendirilebilmesi için aşağıdaki tüm kriterlerin sağlanması gerekmektedir(Anon., 2008a).

- Her 2 sisteme ait kalibrasyon eğrilerinin eğimlerinin [-3,1 ve -3,6] aralığında olması gerekmektedir.

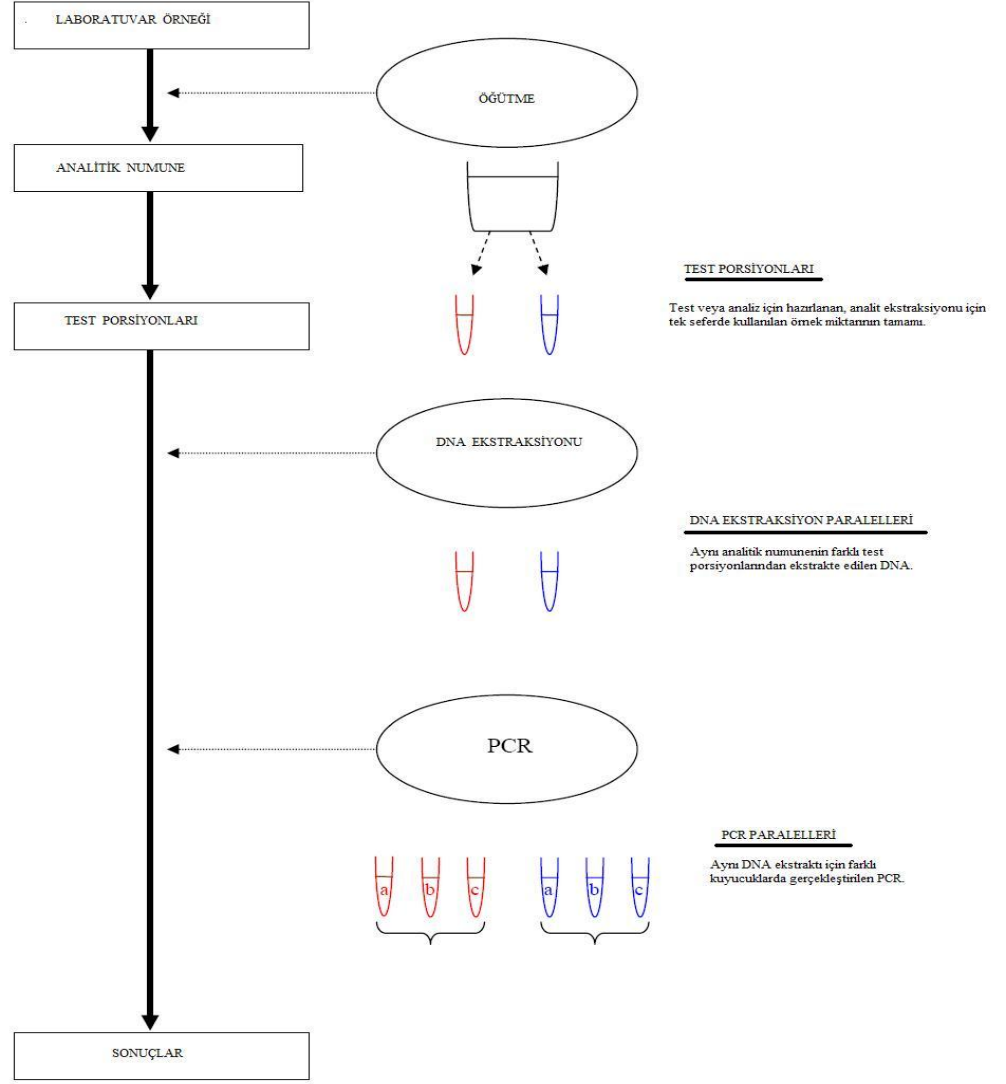
- Her 2 sisteme ait kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayılarının 0,98'den büyük olması gerekmektedir.

- Örneklerin 2 paraleli arasındaki RSD değeri hem lektin hem de MON 89788 sitemi için $\leq$ %25 olmalıdır. Ayrıca her örneğe ait analiz sonucunun (MON 89788 kopya sayısı/ Lektin kopya sayısı) paralelleri arasındaki RSD değeri yine $\leq$ %25 olması gerekmektedir.

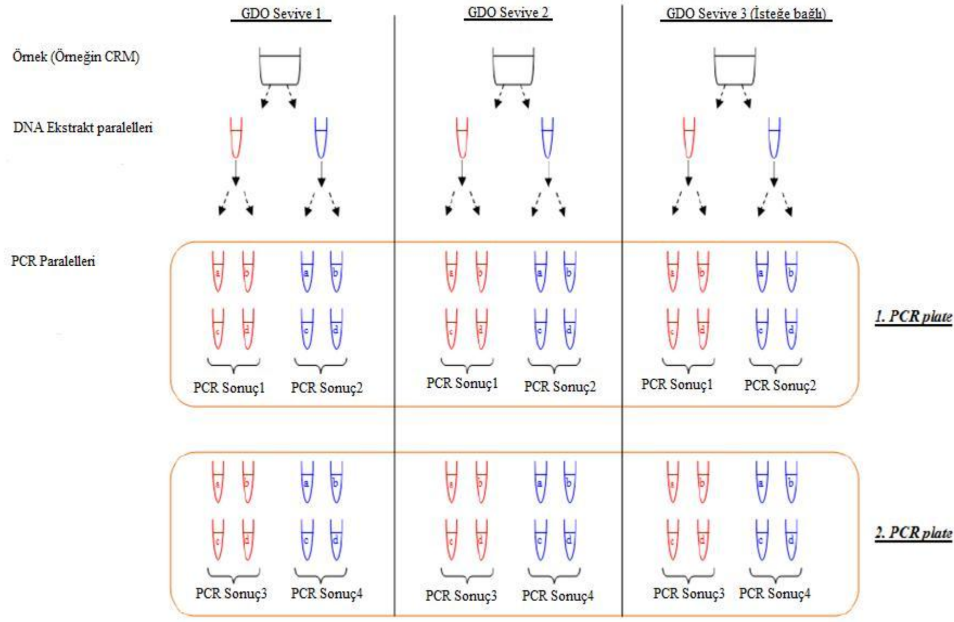
Yukarıdaki tüm kriterler sağlanıyorsa; örneğe ait (MON 89788 kopya sayısı/ lektin kopya sayısı)*100 formülünden MON 89788 % miktarı hesaplanır.

3.2.7 CRL yöntemlerinin verifikasyon çalışması

Miktar analizlerinin verifikasyon çalışması ENGL tarafından yayınlanan "Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods" deneme desenine göre yapılmıştır (Anon., 2011). Buna göre her gen bölgesi için iki farklı seviyede CRM kullanılmıştır. Her CRM iki paralel olarak izole edilmiştir ve bu iki paralelden iki ayrı gün PCR çalışması yapılmıştır.



Şekil. 3.1. Paralel terminolojisi (Anon., 2011a)



Şekil 3.2 Doğruluk ve kesinlik için deneme dizaynı

R^2 değeri ve Amplifikasyon Verimi

- Oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında olmalıdır ki bu da %90-%110 arasında amplifikasyon verimine karşılık gelmektedir.

- Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek olmalıdır.

Doğruluk

- CRM'lerin % GDO değerleri sertifika değerine göre [-%25 ve +%25] aralığında bulunmalıdır.

Tekrarlanabilirlik Standart Sapması

- CRM örneklerinin paralelleri arasındaki RSD %25'den küçük bulunmalıdır.

3.2.7.1 MON 40-3-2 gen bölgesi

MON 40-3-2 miktar analizi verifikasyonu kapsamında;

- MON 40-3-2 gen bölgesinin %10'luk, %0,5'lik ve %0,1'lik CRM'lerinden DNA izolasyonu Eurofins Gene Spin yöntemine göre yapılmıştır.

- İzole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri NanoDrop 2000c cihazında ölçülmüştür.

- Stratagene Mx3000P cihazında CRL yöntemi ile MON 40-3-2 miktar analizi yapılmıştır.

3.2.7.2 A2704-12 gen bölgesi

A 2704-12 miktar analizi verifikasyonu kapsamında;

- %0'lık ve %100'lük DNA'lar %3,6, %1 ve %0,045 oranlarında karıştırılmıştır.

- Stratagene Mx3000P cihazında CRL yöntemi ile A 2704-12 miktar analizi yapılmıştır.

DNA'ların birleştirilmesi

%0 ve %100'lük DNA'lar %3,6, %1 ve %0,045 oranları elde edilecek şekilde karıştırılmıştır. %3,6 GDO'lu CRM kalibrasyon eğrisinde S1 olarak kullanılmıştır. %3,6'lık S1'den %0'lık CRM kullanılarak, seri dilüsyonla kalibrasyon eğrisindeki %1,8, %0,9, %0,45 ve %0,09 seviyeleri elde edilmiştir. %1 ve % 0,045 ise örnek olarak kullanılmıştır.

3.2.7.3 MON89788 gen bölgesi

MON 89788 miktar analizi validasyonu kapsamında;

- MON 89788 gen bölgesinin %0'lık ve %100'lük CRM'lerinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

- İzole edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon değerleri NanoDrop 2000c cihazında ölçülmüştür.

- 50 ng/µl'ye ayarlanan %0'lık ve %100'lük DNA'lar %10, %1 ve %0,1 oranlarında karıştırılmıştır.

- Stratagene Mx3000P cihazında CRL yöntemi ile MON 89788 miktar analizi yapılmıştır.

3.2.7.4 LOD ve LOQ'nun belirlenmesi

GDO miktar analizi verifikasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, ölçüm belirsizliği ve diğer validasyon parametreleri ENGL tarafından 2009 yılında yayınlanan "Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories" dokümanına göre hesaplanır. Dokümanının 15. Sayfasında başlayan formüller sırasıyla uygulanır. Aşağıdaki hesaplamalar bağımsız 2 çalışma (plate) yapıldığı koşullarda geçerlidir.

C_i (ortalama) = $(C_{i1} + C_{i2})/2$ (Denklem 1)

Bu denklemdeki "2" birbirinden bağımsız olarak tekrarlanan çalışma (plate/run) sayısıdır.

C_i (ortlama) = İki sonucun ortalaması

C_{i1} : Örneğin birinci sonucu

C_{i2} : Örneğin ikinci sonucu

$d_i = |C_{i1} - C_{i2}|$ (Denklem 2)

d_i : Konsantrasyonlar arası farkın mutlak değeridir.

$rad_i = (d_i / c_i \text{ ortalama})*100$ (Denklem 3)

rad_i : bağıl fark

$S_R = d_{ortalama} / 1,13$ (Denklem 4)

S_R : Tekrar üretilebilirliğe ait standart sapmadır

1,13 değeri bağımsız 2 çalışma yapıldığı koşullarda sabit sayıdır

$RSD_R = rad\ (ortalama) / 1,13$ (Denklem 5)

RSD_R : bağıl tekrar üretilebilirlik

1,13 değeri bağımsız 2 çalışma yapıldığı koşullarda sabit sayıdır

$\Delta_m = | C_m - C_{CRM} |$ (Denklem 6)

Δ_m : Ölçülen değer ve sertifika değeri arasındaki farkın mutlak değeridir.

C_m : Ölçülen değer

C_{CRM} : Sertifika değeri

$u_\Delta = \sqrt{(u_m^2 + u_{CRM}^2)}$ (Denklem 7)

u_Δ : Ölçülen değerden ve sertifika değerinden gelen birleştirilmiş belirsizlik

$u_m = (S_r / \sqrt{n})$ (Denklem 8)

u_m : Ölçülen sonucun belirsizliği

S_r : Tekrarlanabilirliğin standart sapması

$U_\Delta = 2 * u_\Delta$ (Denklem 9)

U_Δ : Öçülen değer ve sertifika değeri arasındaki genişletilmiş belirsizlik

$u_{biasr} = \sqrt{[(RSD_R^{\ 2} / n) + (100*u_{crm} / c_{crm})^2]}$ (Denklem 10)

u_{biasr} : Bias tan gelen belirsizlik

$RSU = \sqrt{(RSD_R^{\ 2} + u_{biasr}^{\ 2})}$ (Denklem 11)

RSU : Bağıl standart belirsizlik

$u = \sqrt{[u_0^{\ 2} + (c*RSU)^2]}$ (Denklem 12)

u : Ölçüm belirsizliği

$LC = 2 * U_0$ (Denklem 13)

LC : Kritik düzey

$$LOD = (4*u_0) / (1 - 4*RSU^2)$$ (Denklem 14)

$$LOQ = \sqrt{[u_0^2 / RSU_{MAX}^2 - RSU^2)]}$$ (Denklem 15)

RSU_{MAX} değeri ENGL dokümanına göre 0,3 olarak alınmıştır.

*15, 16 ve 17. formüllerde kullanılan u_0 ve RSU değerlerini elde etmek için; ortalama konsantrasyon ve tekrar üretilebilirliğin standart sapması arasında grafik çizilir. Çizilen grafiğin eğimi RSU değeridir, intercepti ise u_0 değeridir.

*Çalışılan 3 gen bölgesi için, yukarıdaki hesaplamalar yapılarak, ölçüm belirsizliği, LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır.

** Çalışılan her örnek için belirsizlik değeri aşağıdaki formülle hesaplanır. Formülde "c" yerine, bulunan % GDO değeri yazılır.*

$$u = \sqrt{[u_0^2 + (c*RSU)^2]}$$

3.2.8 Roll ekmeğin laboratuvar koşullarında yapılması

Roll ekmek; hamurun yapılması, hamura şekil verilmesi, fermentasyon ve pişirme aşamalarından oluşmaktadır. Sıcaklık ve süreden kaynaklı DNA hasarı kabukta daha fazla olduğu için pişirilen ekmeklerde kabuk oluşumunun sabit tutulmasına dikkat edilmiştir.

<ins>Hamurun yapılması:</ins> 3 roll ekmek için; 25 g soya unu (GDO içeren), 115 g buğday unu, 80 ml su, 8 g yaş maya, 1,6 g tuz, 0,8 g şeker olarak belirlendi. Hamur elle 10 dk yoğurulmuştur.

Hamura şekil verilmesi: Yoğurmanın ardından hamur 60 gramlık üç parçaya ayrılmıştır. Avuç içinde elle yuvarlak şekil verilmiştir. Şekil verildikten sonra üç farklı noktadan ölçüm yapılarak çap kontrolü yapılmıştır. Fermentasyon öncesi çap ortalama 7,5 cm iken fermentasyon sonunda 9 cm olmuştur.

Ekmeklerin pişirilmesi: Ekmekler belirli sıcaklık ve belirli sürelerde etüvde pişirilip, oda koşullarında soğuması sağlanmıştır. Soğuyan ekmekler içi ve kabuğu ayrılır, kodlanarak paketlenip, analize kadar -18°C'da saklanmıştır.

Standardize edilen formülasyonda ve şekilde yapılan ekmekler belirli koşullarda pişirilerek, %GDO değişimleri incelenmiştir.

Ekmek hamurunda kullanılan soya unu, soya fasulyesinin 0,5 µm'ye öğütülesi ile elde edilmiştir.

3.2.8.1 Ekmeklerin farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilmesi

Roll ekmekler 3.2.8'de anlatıldığı gibi, Çizelge 3.29.'da belirtilen tüm koşullarda 2 paralel olarak pişirilmiştir. Laboratuvar koşullarındaki pişirme sıcaklıkları ve süreleri de Çizelge 3.29'de gibi belirlenmiştir.

Çizelge 3.29. Ekmeklerin pişirildiği sıcaklık-süre değerleri

Sıcaklık (°C)	**Süre (dakika)**		
220	10	15	20
250	7	11	15
280	5	10	15

3.2.8.2 Fermentasyonun %GDO üzerine etkisi

Fermentasyonun etkisini belirlemek amacıyla başlangıçta kullanılan soya unu, yoğurulan hamur ve fermentasyon sonunda hamurda GDO miktar analizleri yapılmıştır.

3.2.8.3 Ekmek Katkı Maddelerinin %GDO üzerine etkisi

Ekmeğe katılabilecek askorbik asit, sitrik asit, kalsyum propiyonat, SO_2 gibi katkı maddeleri ile kekik, zencefil, keçiboynuzu gibi baharatlar ekmek hamuruna katılarak etkileri araştırılmıştır.

3.2.9 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasında anlamlı bir fark olup olmadığının belirlenebilmesi için varyans analizi (One-way-ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Farklılığın derecesini belirlemek için Duncan testi uygulanmıştır. Bu analizlerde %95 güven seviyesi ($P<0,05$) dikkate alınmıştır. Projenin pişirme denemeleri kısmının istatistiksel analiz ve değerlendirmesi sıcaklık, ve pişirme süreleri (pişirme dereceleri) arasında fark olup olmadığını belirlemeye yönelik "Univariate Varyans Analizi, Duncan post hoc" testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Yöntem Verifikasyonu

Soyaya ait onaylı MON 40-3-2, A2704-12, MON89788 gen bölgelerinin verifikasyon çalışmaları CRL yöntemlerine göre yapılmıştır.

4.1.1 MON 40-3-2 sonuçların değerlendirilmesi

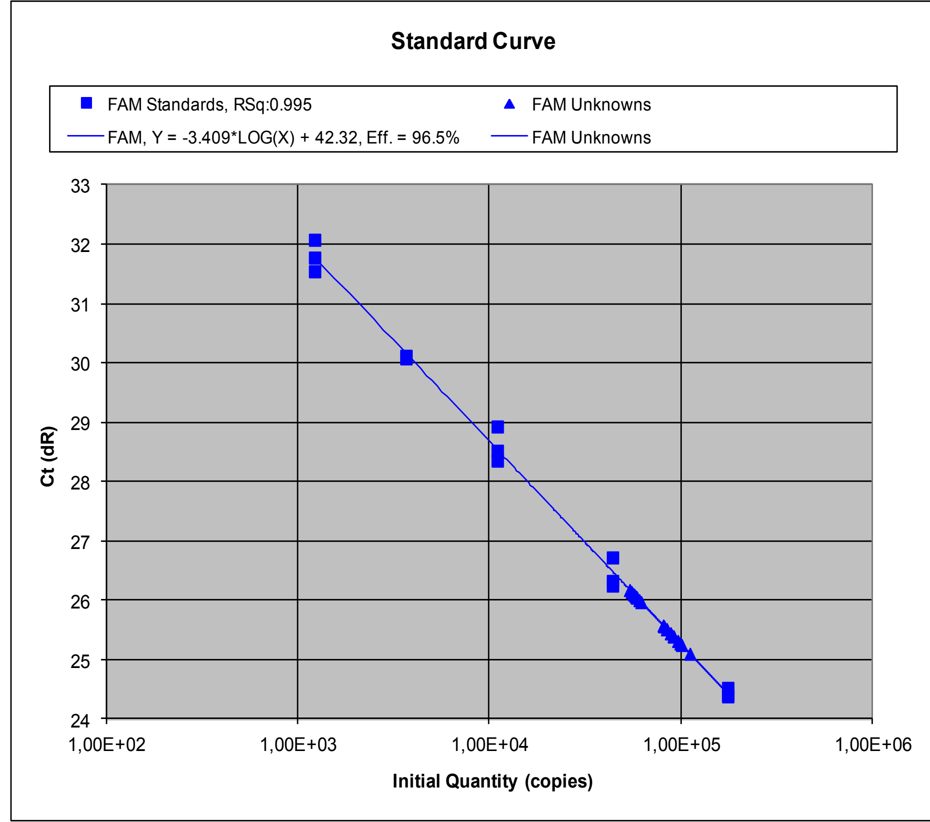
%0,5 ve %0,1'lik MON 40-3-2 CRM'leri ile verifikasyon çalışmaları yapılmıştır.

- Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında saptanmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2)

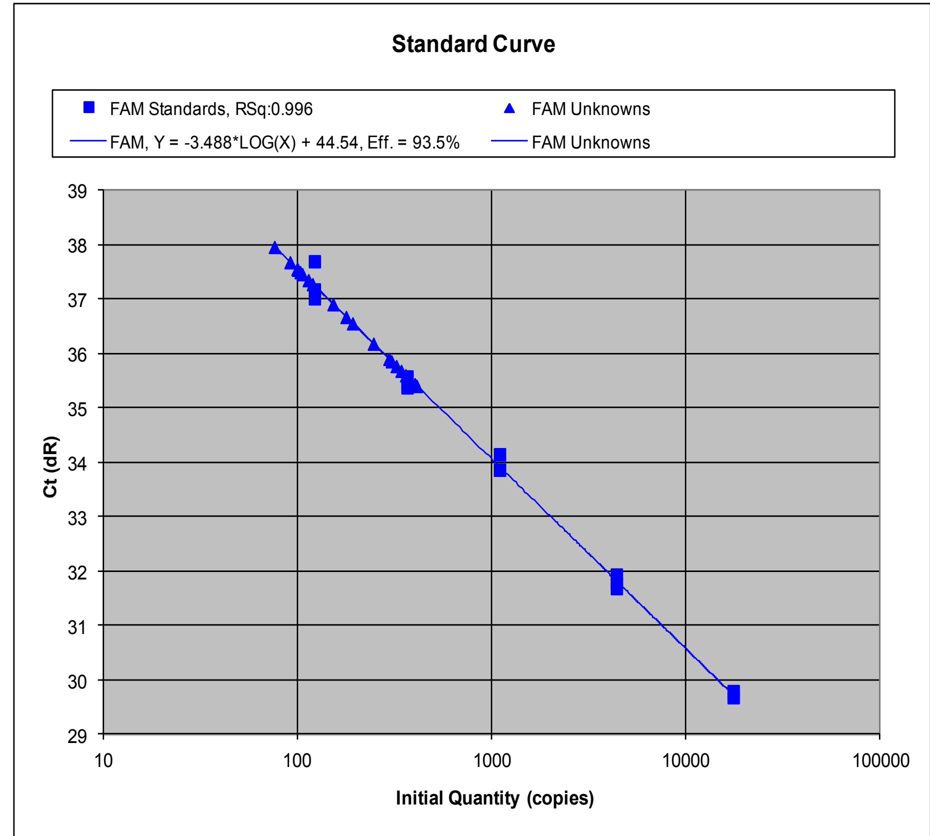
- Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek bulunmuştur (Şekil 4.1 ve 4.2).

- CRM örneklerinin paralelleri arasındaki RSD %25'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.1 ve 4.2).

- Hazırlanan örneklere ait % GDO değerleri beklenen değere göre [-%25 ve +%25] aralığında saptanmıştır.



Şekil 4.1. Lektin Sistemi için elde edilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.2. Mon 40-3-2 Sistemi için elde edilen kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.1 MON40-3-2 Verifikasyon Çalışması 1. Plate

Plate 1													
% GDO	Lektin				MON 40-3-2				Sonuç	Ort.Sonuç	SD	%RSD
	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD				
0,1a	81410,00	86263,33	4724,83	5,48	76,00	95,20	11,86	12,46	0,11	0,12	0,01	6,21
	84840,00				101,00							
	82210,00				101,00							
	84950,00				92,00							
	91860,00											
	92310,00				106,00							
0,1b	88900,00	98093,33	8744,37	8,91	153,00	118,20	21,00	17,77	0,12			
	97050,00				100,00							
	89010,00				114,00							
	101600,00				104,00							
	99800,00				120,00							
	112200,00											
0,5a	61000,00	59083,33	1059,62	1,79	298,00	325,17	51,29	15,77	0,55	0,57	0,03	5,48
	58730,00				247,00							
	58970,00				344,00							
	59200,00				377,00							
	58830,00				306,00							
	57770,00				379,00							
0,5b	58690,00	57866,67	2868,57	4,96	363,00	344,17	80,32	23,34	0,59			
	56960,00				412,00							
	55600,00				403,00							
	54350,00				325,00							
	59230,00				193,00							
	62370,00				369,00							

Çizelge 4.2 MON40-3-2 Verifikasyon Çalışması 2. Plate

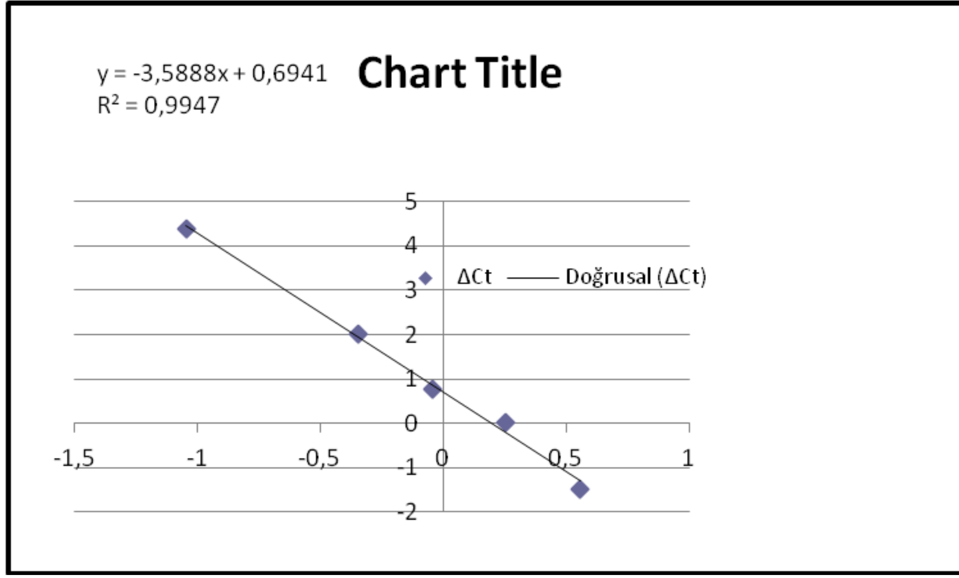
Plate 2													
% GDO	Lektin				MON 40-3-2				Sonuç	Ort.Sonuç	SD	%RSD
	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD				
0,1a	83340,00	91390,00	8079,55	8,84		115,25	12,31	10,68	0,13	0,12	0,01	8,49
	90350,00				129,00							
	83430,00											
	90150,00				120,00							
	104300,00				100,00							
	96770,00				112,00							
0,1b	104600,00	101943,33	12899,65	12,65	131,00	114,00	15,98	14,02	0,11			
	104600,00				103,00							
	101600,00											
	111500,00				124,00							
	112300,00											
	77060,00				98,00							
0,5a	55850,00	52541,67	6289,56	11,97	286,00	307,00	14,75	4,80	0,58	0,57	0,02	4,08
	53860,00				304,00							
	54490,00				331,00							
	56280,00				312,00							
	54940,00				308,00							
	39830,00				301,00							
0,5b	55060,00	57116,67	1795,60	3,14		315,00	32,95	10,46	0,55			
	54970,00				303,00							
	56800,00				350,00							
	59120,00											
	58340,00				275,00							
	58410,00				332,00							

4.1.2 A 2704-12

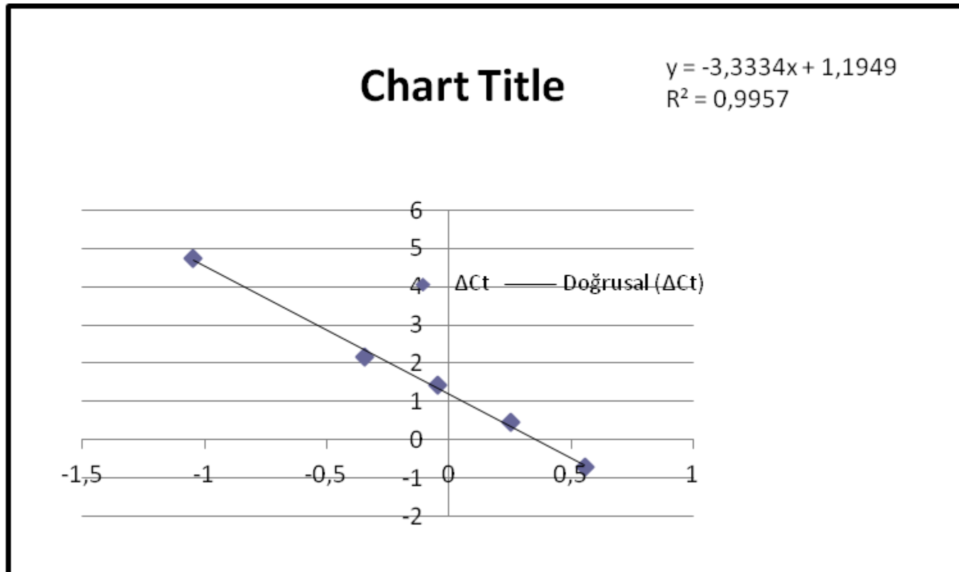
Analiz sonuçlarının değerlendirilmesine ait kriterler:

Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında saptanmıştır.

Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.3. 1. Plate ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.4. 2. Plate ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.3. A2704-12 1. Plate ait %GDO hesaplamalar

GDO ORANI	ΔCt
0,5563	-1,48
0,2553	0,017
-0,04576	0,78
-0,3468	2,013
-1,0458	4,39

x (log % GDO)	y (ΔCt)	Intercept	Eğim
		0,6941	-3,5888
-1,26	5,216	0,6941	-3,5888
-1,32214	5,439	0,6941	-3,5888
0,07972	0,408	0,6941	-3,5888
0,000585	0,692	0,6941	-3,5888

%GDO	X	% GDO	SD	RSD
0,045a	-1,26	0,054954	0,00518	9,426659
0,045b	-1,32214	0,047628		
1a	0,07972	1,20149	0,141522	11,77885
1b	0,000585	1,001348		

CRM örneklerinin paralelleri arasındaki RSD %25'den küçük bulunmuştur.

Hazırlanan örneklere ait % GDO değerleri beklenen değere göre [-%25 ve +%25] aralığında saptanmıştır.

Çizelge 4.4. A2704-12 sistemine 2. Plate ait hesaplamalar

GDO ORANI	ΔCt
0,5563	-0,73
0,2553	0,47
-0,04576	1,437
-0,3468	2,15
-1,0458	4,737

x (log % GDO)	y (ΔCt)	Intercept	Eğim
		1,1949	-3,3334
-1,3485	5,69	1,1949	-3,3334
-1,4724	6,103	1,1949	-3,3334
0,097468	0,87	1,1949	-3,3334
0,053369	1,017	1,1949	-3,3334

%GDO	X	% GDO	SD	RSD
0,045a	-1,3485	0,044823	0,007867	17,55037
0,045b	-1,4724	0,033698		
1a	0,097468	1,251607	0,085455	6,827593
1b	0,053369	1,130756		

4.1.3 MON 89788

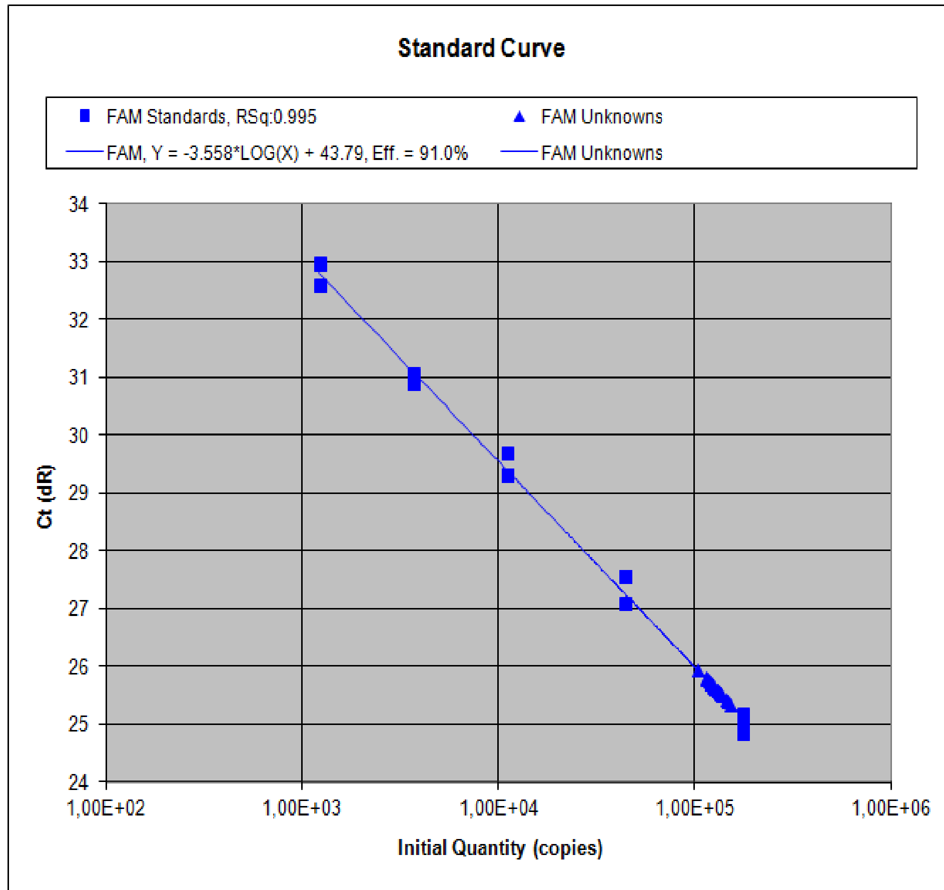
Analiz sonuçlarının değerlendirilmesine ait kriterler:

Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin eğimi [-3,1 ve -3,6] aralığında saptanmıştır.

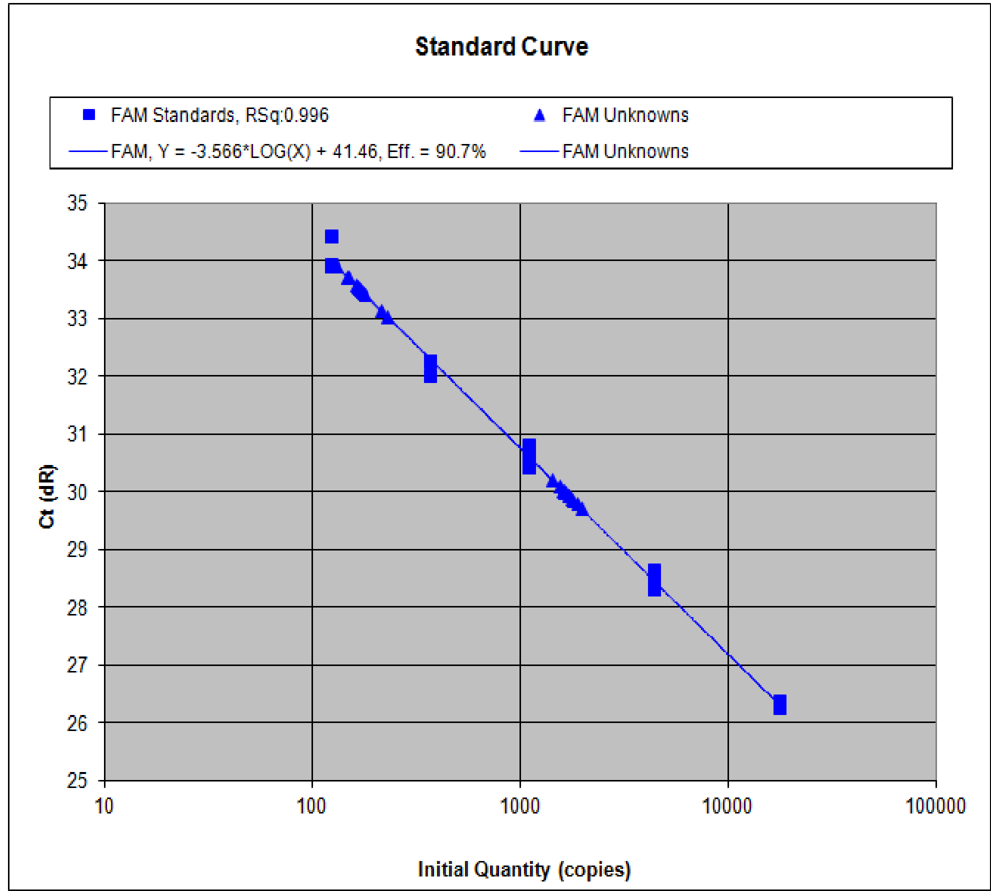
Oluşturulan kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı 0,98'den yüksek bulunmuştur.

CRM örneklerinin paralelleri arasındaki RSD %25'den küçük bulunmuştur.

Hazırlanan örneklere ait % GDO değerleri beklenen değere göre [-%25 ve +%25] aralığında saptanmıştır.



Şekil 4.5. Lektin sistemine ait kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.6. MON 89788 sistemine ait kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.5 MON89788 Verifikasyon çalışması 1. Plate

Plate 1													
% GDO	Lec				MON 89788				Sonuç	Ort.Sonuç	SD	%RSD
	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD				
0,1a	154900	148525,00	8648,07	5,82		197,50	21,11	10,69	0,132974	0,12	0,01	10,14
	139600											
	142700				220							
	156900				179							
					180							
					211							
0,1b		137175,00	5754,06	4,19		158,00	2,94	1,86	0,115181			
	138000											
					158							
	134000				154							
	131800				159							
	144900				161							
1a	148200	143975,00	6408,52	4,45	1648	1678,00	153,38	9,14	1,16548	1,20	0,06	4,60
					1791							
	149600				1473							
	135500				1800							
	142600											
1b		133900,00	13487,03	10,07		1665,50	224,43	13,48	1,243839			
	147300											
	143700				1349							
	121600				1670							
					1788							
	123000				1855							

Çizelge 4.6 MON89788 Verifikasyon çalışması 2. Plate

Plate 2													
	Lec				MON 89788								
Numune	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Kopya Sayısı	Kopya Ort.	SD	RSD	Sonuç	Ort.Sonuç	SD	%RSD
0,1a		134600,00	10001,00	7,43	176	171,25	5,12	2,99	0,127229	0,125409	0,00	2,05
	130200				173							
	148400				164							
	134700											
	125100											
					172							
0,1b		119550,00	2559,30	2,14	149	147,75	12,69	8,59	0,123588			
	121600											
	121000				163							
	119700											
					147							
	115900				132							
1a	135800	135216,67	16936,64	12,53	1710	1630,00	68,30	4,19	1,205473	1,239837	0,05	3,92
	144700				1633							
	152900				1634							
	135900				1543							
	138700											
	103300											
1b	118400	130500,00	9980,58	7,65	1439	1662,83	129,67	7,80	1,274202			
	133100				1797							
	131300				1771							
	124800				1653							
	127500				1704							
	147900				1613							

4.2 Yöntemlerin LOD, LOQ ve diğer validasyon parametreleri

Yapılan verifikasyon çalışmaları sonucunda elde edilen validasyon parametreleri ENGL tarafından 2009 yılında yayınlanan "Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories, 2009"dokümanına göre hesaplanmıştır.

4.2.1 Mon 40-3-2 analizi validasyon parametreleri

Çizelge 4.7. MON40-3-2 Validasyon Parametreleri

Parametrenin Adı	Değeri
Doğruluk	≤ ± %25
S_R (Reproducibility Standart Deviation, Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	0,02
RSD_R (Reproducibility Relative Standart Deviation, Bağıl Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	14,42
Ubias r (%) (Biastan kaynaklanan ölçüm belirsizliği)	25,68
RSU (%) (Relative Standart Uncertanity, Bağıl Standart Belirsizlik)	0,052
*Bias(%) (Hata Oranı)	Seviye 1 için: 15,35 Seviye 2 için: 171,45
LC (Critical Level, Kritik Düzey)	0,028
**Yöntemin LOD Değeri (%) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,045
Hesaplanan LOD Değeri (%, m/m) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,06
**Yöntemin LOQ Değeri (%) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,09
Hesaplanan LOQ Değeri (%, m/m) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,06

*Bias değeri "Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods" dokümanına göre hesaplanmıştır.

** LOD ve LOQ değerleri "Event spesific method for the quantification of soybean line MON 40-3-2 using Real-Time PCR: Protocol" dokümanında yer almaktadır.

4.2.2 Mon 89788 analizi validasyon parametreleri

Çizelge 4.8. MON89788 Validasyon parametreleri

Parametrenin Adı	**Değeri**
Doğruluk	≤ ± %25
S_R (Reproducibility Standart Deviation, Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	0,0157
RSD_R (Reproducibility Relative Standart Deviation, Bağıl Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	9,65
Ubias r (%) (Biastan kaynaklanan ölçüm belirsizliği)	3,94
RSU (%) (Relative Standart Uncertanity, Bağıl Standart Belirsizlik)	0,153
*Bias(%) (Hata Oranı)	Seviye 1 için: 9,06 Seviye 2 için: 11,43
LC (Critical Level, Kritik Düzey)	0,032
**Yöntemin LOD Değeri (%) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,045
Hesaplanan LOD Değeri (%, m/m) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,07
**Yöntemin LOQ Değeri (%) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,09
Hesaplanan LOQ Değeri (%, m/m) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,07

*Bias değeri “Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods” dokümanına göre hesaplanmıştır.

** LOD ve LOQ değerleri “Event spesific method for the quantification of soybean line MON 89788 using Real-Time PCR: Protocol” dokümanında yer almaktadır.

4.2.3 A2704-12 analizi validasyon parametreleri

Çizelge 4.9. A2704-12 Validasyon Parametreleri

Parametrenin Adı	Değeri
Doğruluk	≤ ± %25
S_R (Reproducibility Standart Deviation, Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	0,0158
RSD_R (Reproducibility Relative Standart Deviation, Bağıl Tekrar Üretilebilirlik Standart Sapması)	17,31
Ubias r (%) (Biastan kaynaklanan ölçüm belirsizliği)	8,65
RSU (%) (Relative Standart Uncertanity, Bağıl Standart Belirsizlik)	0,1458
*Bias(%) (Hata Oranı)	Seviye 1 için: 0,56 Seviye 2 için: 0,97
LC (Critical Level, Kritik Düzey)	0,008
**Yöntemin LOD Değeri (%) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,023
Hesaplanan LOD Değeri (%, m/m) (Limit of Detection, Tespit Limiti)	0,02
**Yöntemin LOQ Değeri (%) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,045
Hesaplanan LOQ Değeri (%, m/m) (Limit of Quantification, Ölçüm Limiti)	0,02

*Bias değeri “Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods” dokümanına göre hesaplanmıştır.

** LOD ve LOQ değerleri “Event spesific method for the quantification of soybean line A27-04-12 using Real-Time PCR: Protocol” dokümanında yer almaktadır.

4.3 DNA İzolasyon Sonuçları

Piyasadan temin edilen 20’şer adet soyalı mantı, bisküvi ve soya unu numunerinde Qiagen Mericon, Eurofins Gene Spin ve CTAB yöntemleri ile DNA izolasyonları 2’şer paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Nanodrop’ta ölçülen DNA konsantrasyon ve saflığı Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.10. Üç farklı yöntem ile izole edilen mantı örneklerinin DNA konsantrasyon sonuçları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)
1	$38,8^{Befgh}\pm10,3$	$57,3^{Afg}\pm6,3$	$50,6^{Abcde}\pm10,6$
2	$31,1^{Bfgh}\pm5,4$	$64,6^{Aef}\pm4,1$	$26,8^{Ade}\pm5,1$
3	$32,7^{Bfgh}\pm16,1$	$17,6^{Ah}\pm6,3$	$37,3^{Acde}\pm2,9$
4	$44,6^{Bcdefgh}\pm2,1$	$63,4^{Aef}\pm0,1$	$40,6^{Acde}\pm1,9$
5	$60,7^{Bbc}\pm4,5$	$56,8^{Afg}\pm7,3$	$99,2^{Aabc}\pm36,3$
6	$58,8^{Bbcd}\pm16,7$	$75,9^{Acde}\pm0,5$	$54,2^{Abcde}\pm34,0$
7	$51,7^{Bbcde}\pm5,9$	$70,6^{Acde}\pm3,7$	$93,5^{Aabcd}\pm50,9$
8	$48,1^{Bbcdef}\pm13,8$	$82,9^{Aabc}\pm8,5$	$98,8^{Aabc}\pm31,4$
9	$24,3^{Bh}\pm2,7$	$50,0^{Ag}\pm8,3$	$127,4^{Aa}\pm23,3$
10	$35,5^{Befgh}\pm0,8$	$46,1^{Ag}\pm4,6$	$41,3^{Acde}\pm23,6$
11	$41,2^{Bdefgh}\pm1,7$	$63,3^{Aef}\pm2,8$	$79,5^{Aabcde}\pm21,5$
12	$39,8^{Befgh}\pm5,6$	$78,7^{Abcd}\pm8,8$	$35,2^{Acde}\pm15,9$
13	$63,4^{Bb}\pm1,5$	$91,0^{Aab}\pm4,9$	$89,0^{Aabcde}\pm70,0$
14	$85,7^{Ba}\pm9,2$	$91,6^{Aa}\pm 0,3$	$26,3^{Ae}\pm9,2$
15	$30,6^{Bfgh}\pm2,7$	$65,1^{Aef}\pm2,8$	$93,4^{Aabcde}\pm11,5$
16	$43,9^{Bcdefg}\pm6,4$	$78,6^{Abcd}\pm0,1$	$50,1^{Abcde}\pm3,8$
17	$40,0^{Befgh}\pm5,0$	$72,0^{Acde}\pm12,3$	$89,6^{Aabcde}\pm40,9$
18	$35,4^{Befgh}\pm2,8$	$71,8^{Acde}\pm0,6$	$116,8^{Aab}\pm6,2$
19	$28,3^{Bgh}\pm5,4$	$45,3^{Ag}\pm7,6$	$42,9^{Acde}\pm13,7$
20	$38,2^{Befgh}\pm5,9$	$66,1^{Adef}\pm1,4$	$94,4^{Aabc}\pm1,5$

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir. Büyük harfler izolasyon yöntemleri arasındaki farklılıkları, küçük harfler ise aynı yöntem ile izole edilen mantı örnekleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu 24,3- 87,5 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.10'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu 17,6- 91,6 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında

anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.10'de görülmektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu 26,4- 127,4 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.10'de görülmektedir.

Üç farklı izolasyon yöntemi arasında; mantı örneklerinin DNA konsantrasyonları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre izolasyon yöntemlerine ait gruplar açısından mantı örneklerinin DNA konsantrasyonu bakımından hangi gruba girdiği büyük harflerle yazılarak, Çizelge 4.10'de gösterilmiştir.

CTAB ve Qiagen yöntemleri ile izole edile mantı örneklerinin ortalama DNA konsantrasyonları sırası ile 65,46 ve 69,37 ng/µl bulunurken, Eurofins ile 43,66 ng/µl bulunmuştur. Konsantrasyon açısından değerlendirildiğinde CTAB ve Qiagen yöntemlerinin izolasyon verimlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA saflığı (A260/280) 1,57-1,85 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.11'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA saflığı 1,82-1,88 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir($P>0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği Çizelge 4.11'de görülmektedir.

Çizelge 4.11. Üç farklı yöntemle izole edilen mantı örneklerinin saflık sonuçları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	A(260/280)	A(260/280)	A(260/280)
1	1,78^{Cabc}±0,09	1,85^{Aabcd}±0	1,81^{Babc}±0,01
2	1,71^{Cbc}±0,02	1,86^{Aabcd}±0,01	1,84^{Bab}±0,01
3	1,57^{Cd}±0,05	1,84^{Abcd}±0,05	1,81^{Bbc}±0,02
4	1,72^{Cabc}±0,05	1,87^{Aabc}±0	1,81^{Babc}±0,01
5	1,74^{Cabc}±0,02	1,87^{Aabc}±0,02	1,85^{Ba}±0,01
6	1,80^{Cabc}±0,07	1,88^{Aa}±0,01	1,81^{Babc}±0,05
7	1,73^{Cabc}±0,06	1,88^{Aab}±0,01	1,84^{Bab}±0,01
8	1,72^{Cabc}±0,03	1,87^{Aabc}±0,01	1,83^{Babc}±0,01
9	1,82^{Cab}±0,16	1,88^{Aab}±0	1,84^{Bab}±0,01
10	1,71^{Cabc}±0	1,82^{Ad}±0,02	1,80^{Bbc}±0,02
11	1,76^{Cabc}±0,04	1,82^{Ad}±0,01	1,83^{Babc}±0,01
12	1,77^{Cabc}±0,05	1,85^{Aabcd}±0	1,80^{Bc}±0,03
13	1,80^{Cabc}±0,01	1,85^{Aabcd}±0,01	1,82^{Babc}±0
14	1,79^{Cabc}±0,02	1,85^{Aabcd}±0,01	1,83^{Babc}±0
15	1,66^{Ccd}±0,04	1,83^{Acd}±0,03	1,81^{Babc}±0,01
16	1,84^{Cab}±0,06	1,84^{Aabcd}±0,01	1,83^{Babc}±0
17	1,79^{Cabc}±0,01	1,86^{Aabcd}±0,01	1,84^{Babc}±0
18	1,76^{Cabc}±0,06	1,84^{Aabcd}±0,01	1,84^{Babc}±0,01
19	1,80^{Cabc}±0,01	1,83^{Acd}±0,01	1,83^{Babc}±0,01
20	1,84^{Ca}±0,02	1,84^{Aabcd}±0,01	1,83^{Babc}±0,01

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir. Büyük harfler izolasyon yöntemleri arasındaki farklılıkları, küçük harfler ise aynı yöntem ile izole edilen mantı örnekleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen mantı örneklerinin DNA saflığı 1,80-1,85 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir($P>0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre mantı örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.11'de görülmektedir.

Üç farklı izolasyon yöntemi arasında; mantı örneklerinin DNA saflığı açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre izolasyon yöntemlerine ait gruplar açısından mantı örneklerinin DNA saflığı

bakımından hangi gruba girdiği büyük harflerle yazılarak, Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Eurofins ve Qiagen ile izole edilen DNA’ların ortalama saflık değerleri sırası ile 1,76 ve 1,85 olarak bulunmuştur. CTAB yöntemi ile izole edile mantı örneklerinin DNA saflık ortalaması 1,83 ile ideal saflık olan 1,8’e en yakın değerdir, bu yöntemin gerek konsantrasyon gerekse saflık yönünden değerlendirildiğinde mantı için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir.

Çizelge 4.12. Üç farklı yöntemle izole edilen bisküvi örneklerine ait DNA konsantrasyon sonuçları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)
1	$82,9^{ab}\pm12,5$	$54,7^{de}\pm1,7$	$40,6^{ghı}\pm7,2$
2	$99,6^{a}\pm2,7$	$76,0^{c}\pm3,6$	$34,1^{hı}\pm3,2$
3	$93,1^{a}\pm5,2$	$98,0^{ab}\pm0,4$	$59,7^{defgh}\pm33,5$
4	$53,2^{cdef}\pm4,5$	$62,3^{d}\pm4,7$	$56,4^{efgh}\pm34,4$
5	$50,7^{cdef}\pm7,8$	$49,6^{ef}\pm1,9$	$76,5^{bcde}\pm5,6$
6	$66,9^{bcde}\pm10,4$	$62,6^{d}\pm0,1$	$65,8^{defg}\pm1,3$
7	$15,2^{g}\pm4,8$	$21,1^{h}\pm1,3$	$28,8^{ı}\pm0,5$
8	$66,3^{bcde}\pm5,3$	$102,4^{ab}\pm5,7$	$17,7^{ı}\pm2,5$
9	$47,4^{def}\pm7,5$	$32,9^{g}\pm6,3$	$32,5^{hı}\pm0,3$
10	$62,8^{bcde}\pm17,0$	$47,4^{ef}\pm7,4$	$70,0^{cdef}\pm2,0$
11	$55,4^{cdef}\pm10,4$	$59,1^{d}\pm4,1$	$84,8^{abcd}\pm2,3$
12	$41,0^{f}\pm0,5$	$36,2^{g}\pm3,5$	$63,8^{defg}\pm5,2$
13	$62,4^{bcde}\pm11,1$	$47,6^{ef}\pm1,9$	$28,1^{ı}\pm9,7$
14	$67,1^{bcde}\pm0,5$	$60,8^{d}\pm1,9$	$79,5^{bcde}\pm4,9$
15	$96,1^{a}\pm7,3$	$55,0^{de}\pm1,1$	$97,5^{ab}\pm0,1$
16	$71,8^{bc}\pm22,1$	$45,8^{f}\pm0,7$	$63,8^{defg}\pm9,4$
17	$45,8^{ef}\pm2,1$	$76,0^{c}\pm3,5$	$96,0^{abc}\pm2,2$
18	$68,8^{bcd}\pm1,5$	$105,1^{a}\pm3,1$	$110,1^{a}\pm5,7$
19	$65,2^{bcde}\pm4,0$	$94,6^{b}\pm7,0$	$56,7^{efgh}\pm5,2$
20	$20,2^{g}\pm3,6$	$23,9^{h}\pm0,3$	$42,4^{fghı}\pm0,8$

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu 12,2-99,6 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.12'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu 21,1-105,0 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.12'de görülmektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu 17,7-110,0 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.12'de görülmektedir.

Üç izolasyon yöntemi arasında; bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$).

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA saflığı (A260/280) 1,70-1,86 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir($P>0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.13'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA saflığı 1,83-1,87 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir($P>0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği Çizelge 4.13'de görülmektedir.

Çizelge 4.13. Üç farklı yöntemle izole edilen bisküvi örneklerine ait DNA saflık sonuçları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	A(260/280)	A(260/280)	A(260/280)
1	$1,84^{Cab}$±0,02	$1,86^{Babc}$±0,01	$1,89^{Aab}$±0,02
2	$1,82^{Cabc}$±0,03	$1,87^{Bab}$±0,01	$1,92^{Aa}$±0,01
3	$1,84^{Cabc}$±0,01	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,90^{Aab}$±0,02
4	$1,76^{Cabc}$±0,04	$1,84^{Bbc}$±0,01	$1,88^{Aab}$±0,03
5	$1,86^{Ca}$±0,01	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,88^{Aab}$±0,01
6	$1,85^{Ca}$±0,04	$1,87^{Bab}$±0,01	$1,88^{Aabc}$±0
7	$1,70^{Cc}$±1,02	$1,87^{Ba}$±0,01	$1,92^{Aa}$±0
8	$1,79^{Cabc}$±0,06	$1,87^{Bab}$±0,01	$1,81^{Ac}$±0,03
9	$1,76^{Cabc}$±0,02	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,90^{Aa}$±0,03
10	$1,79^{Cabc}$±0,04	$1,86^{Babc}$±0,03	$1,86^{Aabc}$±0,02
11	$1,81^{Cabc}$±0,01	$1,85^{Babc}$±0	$1,87^{Aabc}$±0,04
12	$1,84^{Cab}$±0,01	$1,84^{Bbc}$±0,01	$1,83^{Abc}$±0,06
13	$1,82^{Cabc}$±0,02	$1,83^{Bc}$±0,01	$1,85^{Aabc}$±0,04
14	$1,83^{Cab}$±0,01	$1,83^{Bc}$±0,01	$1,88^{Aabc}$±0,01
15	$1,84^{Cab}$±0,03	$1,84^{Bbc}$±0,01	$1,86^{Aabc}$±0,01
16	$1,84^{Cab}$±0,02	$1,84^{Bbc}$±0	$1,87^{Aabc}$±0,01
17	$1,84^{Cab}$±0,04	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,85^{Aabc}$±0,01
18	$1,80^{Cabc}$±0,01	$1,86^{Babc}$±0,01	$1,87^{Aabc}$±0,01
19	$1,84^{Cab}$±0,04	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,85^{Aabc}$±0,01
20	$1,73^{Cbc}$±0,13	$1,85^{Babc}$±0,01	$1,87^{Aabc}$±0,01

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir. Büyük harfler izolasyon yöntemleri arasındaki farklılıkları, küçük harfler ise aynı yöntem ile izole edilen bisküvi örnekleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen bisküvi örneklerinin DNA saflığı 1,81-1,92 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre bisküvi örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.13'de görülmektedir.

Üç izolasyon yöntemi arasında; bisküvi örneklerinin DNA saflığı açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre izolasyon yöntemlerine ait gruplar açısından bisküvi örneklerinin DNA saflığı bakımından hangi gruba girdiği büyük harflerle yazılarak, Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Üç yönteme ait DNA konsantrasyon ortalamaları; Eurofins için 1,81, Qiagen için 1,86, CTAB için 1,88 olarak bulunmuştur. Bisküvi için en uygun izolasyon yönteminin Eurofins olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.14. Üç farklı yöntemle izole edilen soya ununa ait DNA'ların konsantrasyon sonuçları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)	Nükleik Asit Konst. (ng/µl)
1	54,2$^{\text{Abcde}}$±1,35	30,7$^{\text{Bıj}}$±10,7	6,7$^{\text{Bg}}$±2,6
2	87,3$^{\text{Abc}}$±11,5	60,5$^{\text{Bbcde}}$±4,5	48,6$^{\text{Bcdefg}}$±0,4
3	44,8$^{\text{Acde}}$±0,4	26,5$^{\text{Bj}}$±2,8	7,9$^{\text{Bg}}$±4,9
4	44,2$^{\text{Ade}}$±3,8	41,7$^{\text{Bfghıj}}$±4,4	23,3$^{\text{Bdefg}}$±3,0
5	51,5$^{\text{Abcde}}$±6,6	33,2$^{\text{Bhıj}}$±3,8	21,0$^{\text{Bdefg}}$±0,7
6	57,1$^{\text{Abcde}}$±5,8	34,0$^{\text{Bghıj}}$±5,0	21,9$^{\text{Bdefg}}$±10,1
7	81,7$^{\text{Abcd}}$±22,2	49,2$^{\text{Bdefg}}$±0,9	45,6$^{\text{Bcdefg}}$±27,3
8	142,1$^{\text{Aa}}$±30,7	90,6$^{\text{Ba}}$±0,2	23,0$^{\text{Bdefg}}$±3,0
9	156,0$^{\text{Aa}}$±47,8	105,3$^{\text{Ba}}$±10,1	152,7$^{\text{Ba}}$±13,6
10	88,7$^{\text{Ab}}$±4,1	48,5$^{\text{Bdefgh}}$±0,2	25,6$^{\text{Bdefg}}$±4,5
11	181,7$^{\text{Aa}}$±39,8	96,2$^{\text{Ba}}$±5,8	59,7$^{\text{Bbcdef}}$±45,8
12	153,5$^{\text{Aa}}$±14,9	99,5$^{\text{Ba}}$±3,7	98,5$^{\text{Bb}}$±59,0
13	36,1$^{\text{Ae}}$±4,7	40,2$^{\text{Bfghıj}}$±6,2	49,3$^{\text{Bbcdefg}}$±32,7
14	63,5$^{\text{Abcde}}$±9,1	74,9$^{\text{Bb}}$±10,8	65,0$^{\text{Bbcde}}$±11,4
15	44,6$^{\text{Acde}}$±5,7	38,6$^{\text{Bfghıj}}$±1,9	12,8$^{\text{Bfg}}$±10,3
16	45,8$^{\text{Acde}}$±4,1	50,7$^{\text{Bdef}}$±4,9	40,9$^{\text{Bcdefg}}$±1,6
17	35,9$^{\text{Ae}}$±8,4	45,8$^{\text{Bedghı}}$±2,3	26,8$^{\text{Bdefg}}$±14,9
18	59,9$^{\text{Abcde}}$±9,6	62,5$^{\text{Bbcde}}$±5,1	15,8$^{\text{Befg}}$±3,1
19	54,2$^{\text{Abcde}}$±6,7	72,8$^{\text{Bbc}}$±13,0	81,6$^{\text{Bbc}}$±25,2
20	59,2$^{\text{Abcde}}$±7,6	59,0$^{\text{Bcde}}$±10,9	70,3$^{\text{Bbcd}}$±6,7

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir. Büyük harfler izolasyon yöntemleri arasındaki farklılıkları, küçük harfler ise aynı yöntem ile izole edilen soya unu örnekleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu 35,9-181,7 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0{,}05$). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.14'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu 26,5-105,3 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.14'de görülmektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu 6,7-152,7 ng/µl arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA konsantrasyonu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.14'de görülmektedir.

Üç izolasyon yöntemi arasında; soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Duncan testi sonuçlarına göre izolasyon yöntemlerine ait gruplar açısından soya unu örneklerinin DNA konsantrasyonu bakımından hangi gruba girdiği büyük harflerle yazılarak, Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

CTAB ve Qiagen yöntemleri ile izole edile soya unu örneklerinin ortalama DNA konsantrasyonları sırası ile 44,87 ve 58,05 ng/µl bulunurken, Eurofins ile 77,13 ng/µl bulunmuştur. Konsantrasyon açısından değerlendiriliğinde Eurofins yönteminin izolasyon veriminin daha yüksek olduğu görülmektedir ve soya unu için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir.

Eurofins Gene Spin yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA saflığı (A260/280) 1,69-1,87 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.15'de görülmektedir.

Qiagen Mericon yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA saflığı 1,78-1,88 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği Çizelge 4.15'de görülmektedir.

Çizelge 4.15. Üç farklı yöntemle izole edilen soya ununa ait DNA’ların saflık sonuçları ve standart sapmaları[a]

	Eurofins Gene Spin	Qiagen Mericon	CTAB
Örnek No:	A(260/280)	A(260/280)	A(260/280)
1	1,77^{Abcde}±0,02	1,83^{Abc}±0,02	0,87^{Bde}±0,02
2	1,79^{Aabcde}±0,01	1,83^{Abc}±0,01	0,87^{Bde}±0,02
3	1,72^{Aef}±0,04	1,85^{Ab}±0,02	0,94^{Bd}±0,05
4	1,81^{Aabcd}±0,01	1,88^{Aa}±0,02	0,92^{Bd}±0,01
5	1,79^{Aabcde}±0,07	1,85^{Ab}±0,01	0,85^{Bdef}±0,03
6	1,78^{Abcde}±0,02	1,85^{Ab}±0,01	1,07^{Bc}±0,07
7	1,82^{Aabcd}±0,02	1,81^{Acd}±0,01	0,92^{Bd}±0,02
8	1,83^{Aabc}±0	1,86^{Aab}±0	1,80^{Ba}±0,01
9	1,87^{Aa}±0,02	1,85^{Ab}±0	1,85^{Bdef}±0,01
10	1,82^{Aabcd}±0,02	1,85^{Ab}±0,01	0,94^{Bd}±0,11
11	1,82^{Aabcd}±0,01	1,85^{Ab}±0,01	1,83^{Ba}±0,01
12	1,85^{Aab}±0,02	1,85^{Ab}±0,01	1,84^{Ba}±0,02
13	1,69^{Af}±0,04	1,80^{Ade}±0,01	0,74^{Bfg}±0,07
14	1,80^{Aabcde}±0,04	1,85^{Ab}±0,01	0,84^{Bdef}±0,06
15	1,74^{Acdef}±0,01	1,84^{Abc}±0,01	0,84^{Bdef}±0,09
16	1,75^{Acdef}±0,02	1,85^{Ab}±0,01	0,71^{Bg}±0,02
17	1,75^{Acdef}±0,01	1,78^{Ae}±0,02	0,76^{Befg}±0,04
18	1,76^{Acdef}±0,07	1,80^{Ade}±0,01	1,22^{Bb}±0,01
19	1,77^{Acde}±0,01	1,83^{Abc}±0	0,85^{Bdef}±0,04
20	1,77^{Acde}±0,01	1,85^{Ab}±0,01	0,82^{Bdefg}±0

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir. Büyük harfler izolasyon yöntemleri arasındaki farklılıkları, küçük harfler ise aynı yöntem ile izole edilen soya unu örnekleri arasındaki farklılıkları göstermektedir.

CTAB yöntemi ile izole edilen soya unu örneklerinin DNA saflığı 0,71-1,85 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda bu yöntemle izole edilen örneklerin DNA saflığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre soya unu örneklerinin DNA saflığı açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.15’de görülmektedir.

Üç izolasyon yöntemi arasında; soya unu örneklerinin DNA saflığı açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre izolasyon yöntemlerine ait gruplar açısından soya unu örneklerinin DNA

saflığı bakımından hangi gruba girdiği büyük harflerle yazılarak, Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.

Eurofins ve Qiagen ile izole edilen DNA'ların ortalama saflık değerleri sırası ile 1,79 ve 1,84 olarak bulunmuştur. CTAB yöntemi ile izole edile soya unu örneklerinin DNA saflık ortalaması 1,08 olarak bulunmuştur ve bu yöntem ile izole edilen DNA'lardan proteinlerin uzaklaştırılamadığı ve bu yöntem soya ununa uygun bulunmamıştır. Eurofins ile izole edilen örneklerin DNA saflık ortalaması 1,79 ile ideal saflık olan 1,8'e en yakın değerdir, bu yöntemin gerek konsantrasyon gerekse saflık yönünden değerlendirildiğinde soya unu için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir. Bu nedenle pişirme denemelerindeki örneklerin DNA izolasyonları Eurofins Gene Spin yöntemi ile yapılmıştır.

Bellochi et al. 2010 tarafından yapılan çalışmada CTAB, Wizard ve Dellaporta yöntemleri kullanılarak gıda ve yemlerde (yem, bisküvi, CRM%1) için DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve valide olan RRS bölgesi için miktar analizi yapılarak verimlilik karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak uygulanan ekstraksiyon yöntemleri ile validasyonu yapılmış GDO miktarı arasında bisküviye uygulanan Wizard yöntemi haricinde diğerlerinde farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

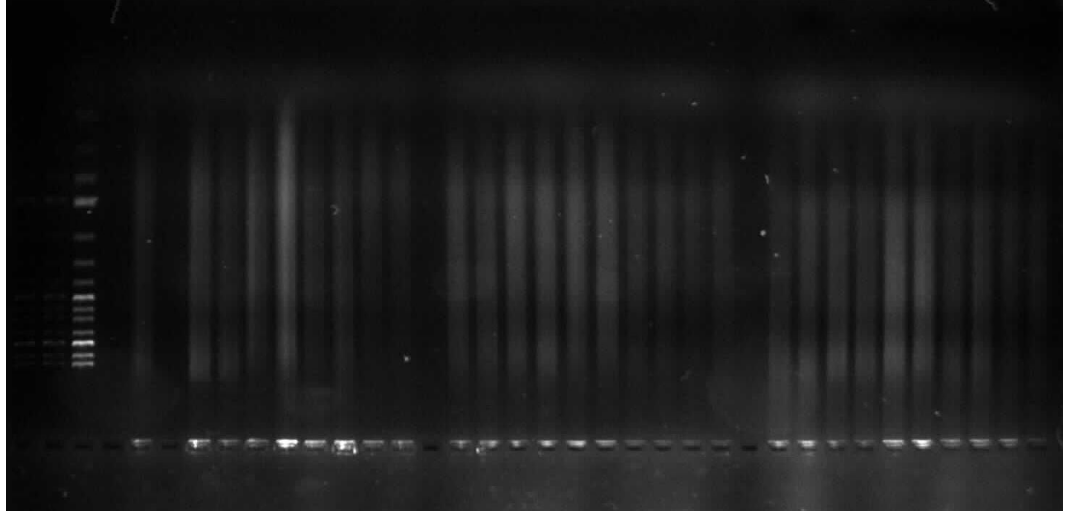
4.3.1 Jel Elektroforezi görüntüleri

İzole edilen DNA'ların jel elektroforezi görüntüleri bisküvi için Şekil 4. 7'de, mantı için Şekil 4.8'de, soya unu için de Şekil 4.9'de görülmektedir. Tüm jellerde ilk on kuyucuk CTAB, ikinci on kuyucuk Eurofins ve son on kuyucuk da Qiagen yöntemleri ile izole edilen DNA'lardır.

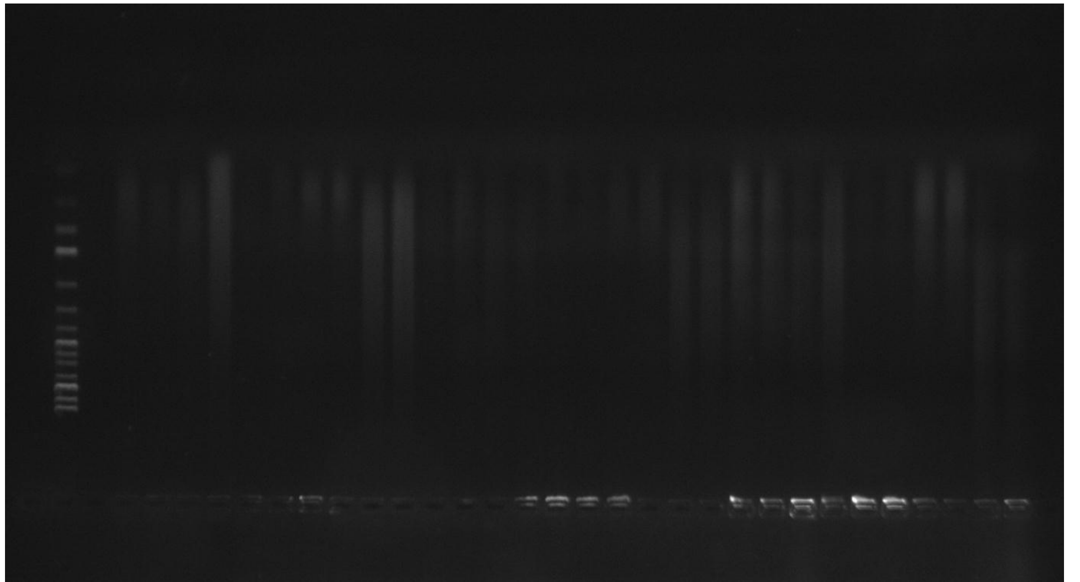
Jel görüntülerine bakıldığında bisküvi örneklerinde üç yöntemle de benzer görüntü elde edildiği görülmektedir. Bisküvi işlenmiş bir ürün olduüu için DNA zarar görmüştür ve genomik DNA için belirgin bant gözlenememiştir, smear kırıklı görüntü gözlenmektedir. Bunun nedeni izolasyon yöntemleri değil örneğin işlenmiş olmasıdır.

Mantı örneklerinin jel görüntülerine bakıldığında izolasyon yöntemleri arasında belirgin farklılık görülmemektedir. Bisküvi ile benzer olarak DNA'da smear görüntüsü mevcuttur. Mantı da ısıl işlem görmüş bir üründür bu nedenle böyle bir görüntü elde edilmiştir.

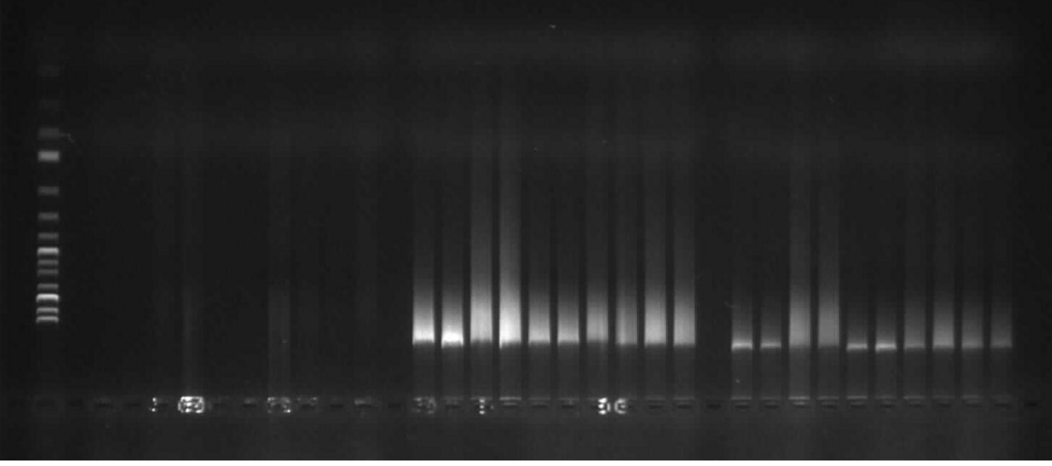
Soya unu örneklerine bakıldığında yöntemler arasında belirgin farklılıklar görülmektedir. CTAB yönteminin (jeldeki soldan ilk on kuyucuk) soya unundan DNA izolasyonuna uygun olmadığı gözlenmiştir. Bu yöntemle izole edilen örneklerde herhangi bir DNA bandı gözlenmemiştir. Eurofins (ikinci on kuyucuk) ve Qiagen(üçüncü on kuyucuk) ticari kitleri ile izole edilen örnek DNA'larında gayet iyi kalitede bantlar görülmektedir. Eurofins ile izole edilen DNA'lar daha parlak bantlar verirken yukarı doğru gözlenen smear görüntüsünün RNA'nın tam uzaklaştırılamamasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Qiagen ile izole edilen örneklerde bantlarda smear oldukça az gözlenmekte ve daha saf DNA elde edildiği düşünülmektedir. Soya unu, mantı ve bisküvi gibi ısıl işlem görmediği için jelde belirgin DNA bantları gözlenebilmiştir.



Şekil 4.7. Bisküvi örneklerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.8. Mantı örneklerine ait jel görüntüsü

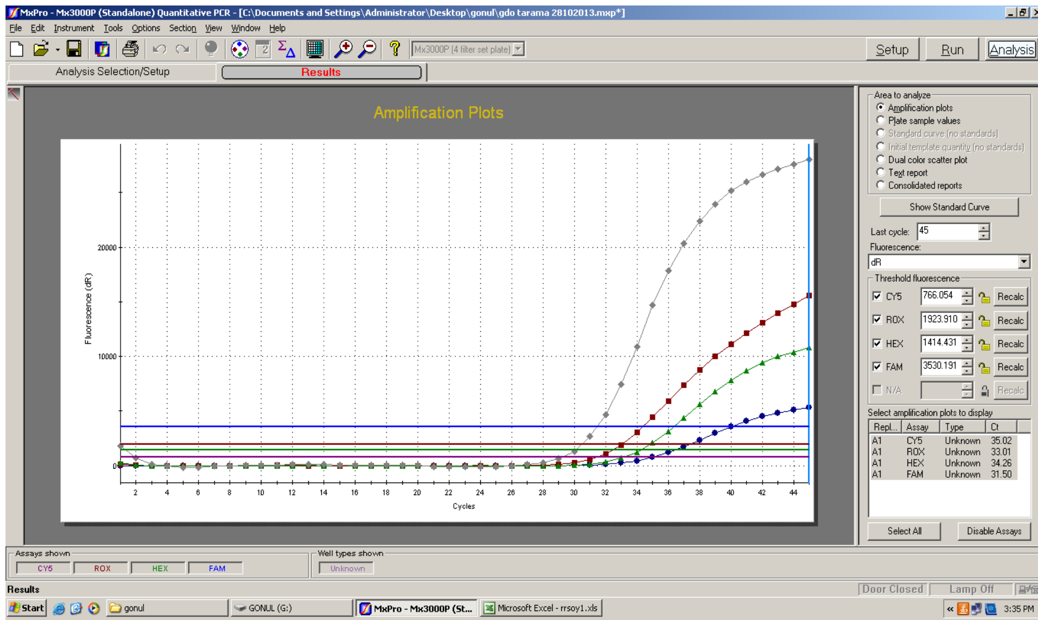


Şekil 4.9. Soya unu örneklerine ait jel görüntüsü

4.4 GDO Tarama Analiz Sonuçları

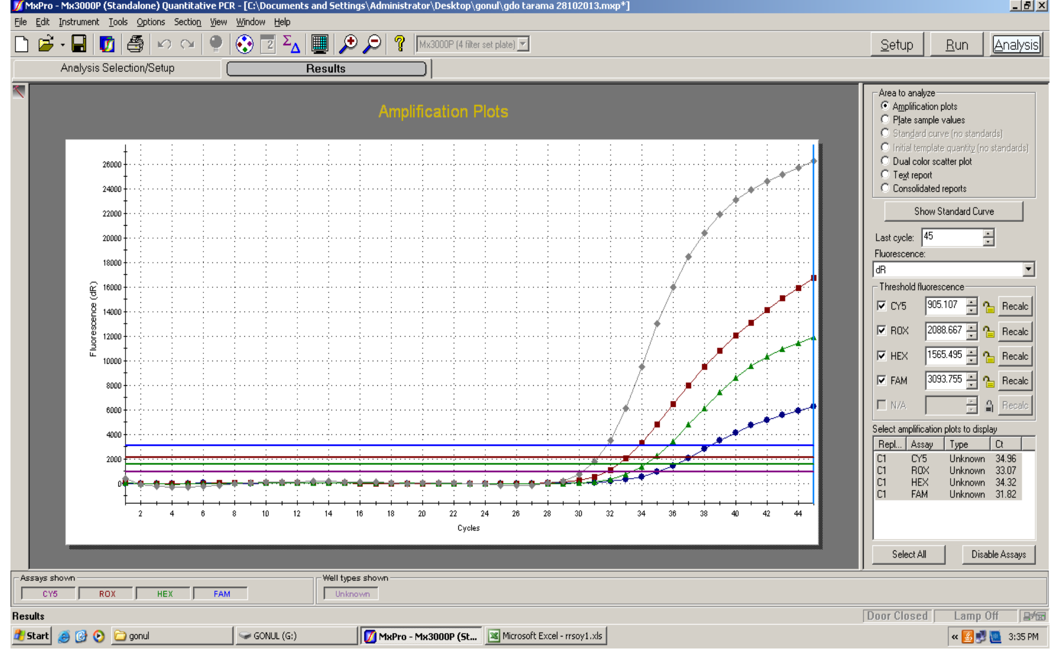
20’şer adet soyalı mantı, bisküvi ve soya unu numunelerinde GDO Tarama Analizi Eurofins Gene Scan GMO Kit Protokolu’ne göre gerçekleştirilmiştir. 35S, FMV promotor ve NOS terminatör bölgeleri taranmıştır.

Analiz sonuçlarının değerlendirilebilmesi için iki paralel pozitif kontrol Şekil 4.10’ de görüldüğü gibi 3 bölge (35S, NOS, FMV) için ve IPC (Internal pozitif kontrol) için amplifikasyon vermelidir.



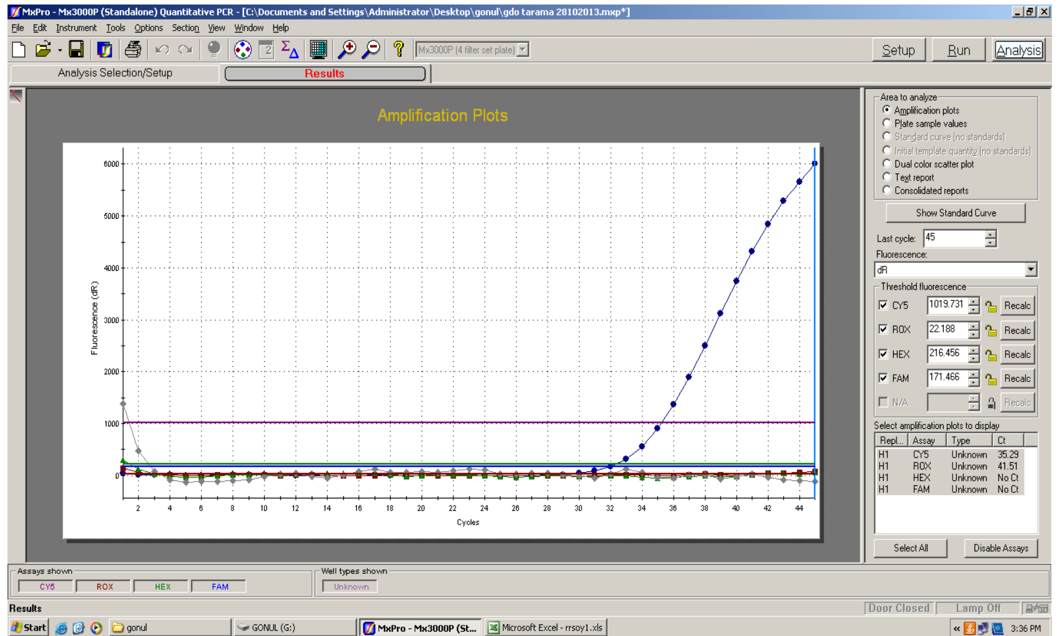
Şekil 4.10. Pozitif Kontrol’e ait amplifikasyon eğrisi

GDO Tarama analizinde 35S, NOS ve FMV'nin pozitif olduğu Mon 89034'e ait CRM kullanılmıştır. Analiz sonuçlarının değerlendirilebilmesi için iki paralel CRM Şekil 4.11' de görüldüğü gibi 3 bölge için ve IPC (Internal pozitif kontrol) için amplifikasyon vermelidir.

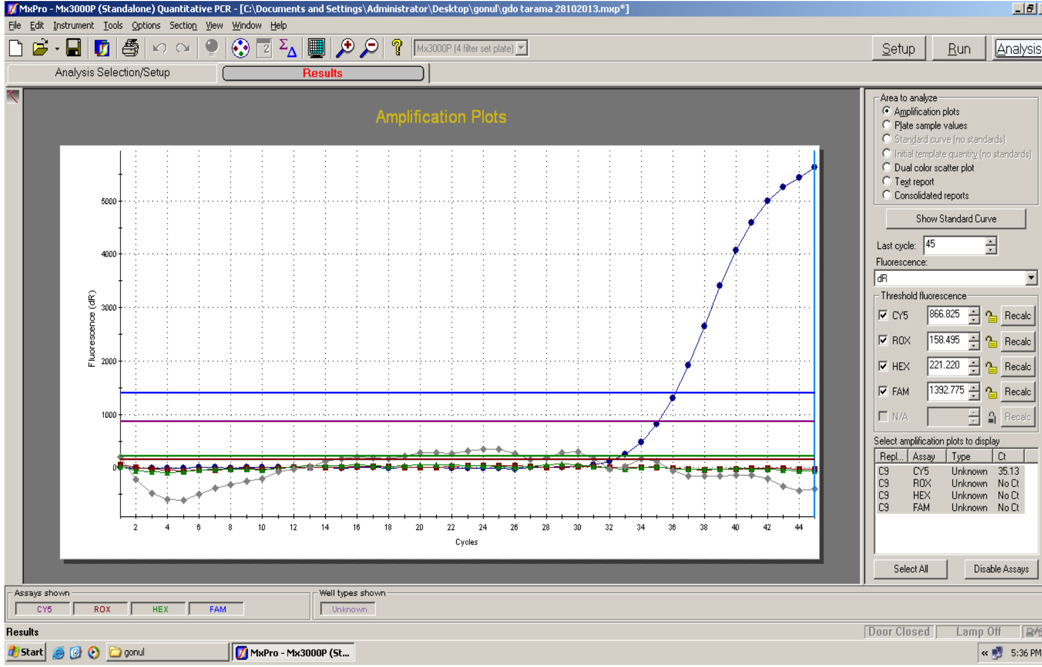


Şekil 4.11. CRM'e ait amplifikasyon eğrileri

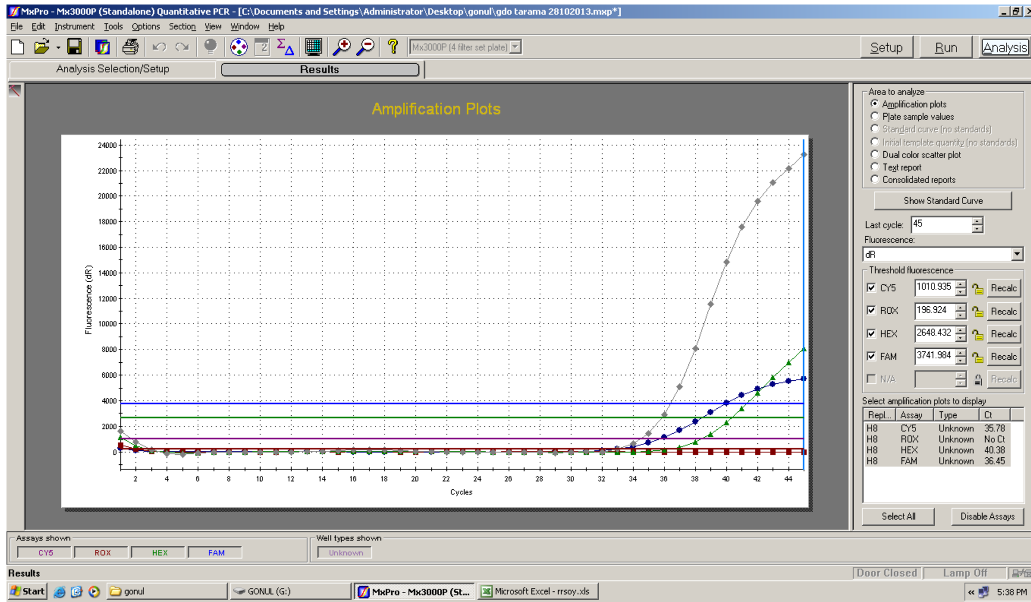
Analiz sonuçlarının değerlendirilebilmesi için iki paralel negatif kontrol Şekil 4.12' de görüldüğü gibi sadece IPC(Internal pozitif kontrol) için amplifikasyon vermelidir. Aksi durumuda sistemde ya da master miskte bulaşma olduğu anlamına gelir ve analiz sonucu değerlendirilemez.



Şekil 4.12. Negatif kontrole ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.13. Negatif bir örneğe ait amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.14. 35S ve NOS pozitif örneğe ait amplifikasyon eğrisi

GDO Tarama analizi iki paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Paraleller arası uyumsuzluk olması durumunda tekrar DNA izolasyonu yapılarak analiz tekrar edilmiştir.

Çizelge 4.16'da görüldüğü gibi bisküvi numunelerinin hiçbirinde GDO "35S, NOS, FMV Tespit edilememiş" tir.

Çizelge 4.16. Bisküvi GDO Tarama Analiz sonuçları

	35S	NOS	FMV
B1	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B2	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B3	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B4	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B5	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B6	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B7	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B8	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B9	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B10	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B11	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B12	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B13	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B14	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B15	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B16	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B17	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B18	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B19	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
B20	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi

Çizelge 4.17'de görüldüğü gibi mantı nunumunelerinin iki tanesinde GDO "35S, NOS, Tespit edilmiştir", "FMV Tespit edilmemiş"tir. Diğer 18 tanesinde "35S, NOS, FMV Tespit Edilmemiş"tir.

Arun ve ark. (2013) yılında yapılan çalışmada Türkiye'de yerel marketlerden rasgele temin edilen 100 adet soya ve mısır içeren (az işlenmiş ve çok işlenmiş) örneklerde 35S ve NOS taramışlardır. Örnek olarak soya içeren örnekler olarak soya sütü, soya filizi, soya sosu, soya unu, ekmek, bisküvi, et ürünleri, bebek maması, ekmek karışımı, soya fasulyesi, toz çorba, soya eti, mısır içeren örnekler mısır unu, konserve mısır, nişasta, tane mısır çalışmışlardır. Analiz edilen örneklerin %25'inde GDO tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. Mantı GDO Tarama Analiz sonuçları

	35S	NOS	FMV
M1	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
M2	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M3	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M4	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M5	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M6	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M7	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M8	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M9	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M10	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M11	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M12	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M13	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M14	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M15	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M16	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
M17	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M18	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M19	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
M20	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi

Çizelge 4.18'de soya unu numunelerine ait GDO tarama analiz sonuçları görülmektedir. Soya unu numunelerinden 7 tanesinde GDO tespit edilmiştir. Örneklerden 2 tanesinde "35S, NOS, FMV", 5 tanesinde "35S, NOS" tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. Soya Unu GDO Tarama Analiz Sonuçları

Örnek No	35S	NOS	FMV
S1	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
S2	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S3	T.Edildi	T.Edildi	T.Edildi
S4	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S5	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
S6	T.Edildi	T.Edildi	T.Edildi
S7	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S8	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S9	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S10	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S11	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S12	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
S13	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S14	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S15	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S16	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S17	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
S18	T.Edildi	T.Edildi	T. Edilemedi
S19	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi
S20	T. Edilemedi	T. Edilemedi	T. Edilemedi

4.5. Gen Tanımlama (Ident) Analizleri Sonuçları

GDO Tarama analizi pozitif olan numunelerde soyaya ait Mon40-3-2, Mon89788 ve A2704-12 gen bölgeleri taranmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.19'da görülmektedir.

Çizelge 4.19. GDO pozitif mantı ve soya unu gen tanımlama (ident) analizi sonuçları

Örnek No	Mon 40-3-2	Mon 89788	A2704-12
M1	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
M16	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
S1	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
S3	Tespit edildi.	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.
S5	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
S6	Tespit edildi.	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.
S12	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
S17	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.
S18	Tespit edildi.	Tespit edilemedi.	Tespit edilemedi.

4.6. Miktar Analizleri

Tanımlama analizinde pozitif olan örnekler miktar analizine alınmıştır. İki paralel olarak izole edilen DNA'lar PCR'da üç paralel olarak çalışılmıştır.

4.6.1 Mon 40-3-2 miktar analiz sonuçları

Soya unu ve mantı örnekleri %MON 40-3-2 analiz sonuçları çizelge 4.20'de görülmektedir.

Çizelge 4.20. Mon 40-3-2 analizi miktar analizi sonuçları ve standart sapmaları[a]

Örnek No	% Mon 40-3-2
M1	<LOQ
M16	<LOQ
S1	$1,24^{b}$ ± 0,25
S3	$0,82^{b}$ ± 0,06
S5	<LOQ
S6	$69,87^{a}$ ± 5,74
S12	<LOQ
S17	<LOQ
S18	<LOQ

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir

Mantı örneklerinin ikisinde MON 40-3-2 miktarı LOQ’den küçük bulunmuştur. Soya unlarından dört tanesi LOQ’den küçük bulunurken diğer üç örnekte % 0,82 ile % 69,87 arasında MON 40-3-2 tespit edilmiş ve örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$).

4.6.2 Mon 89788 miktar analizi sonucu

İki adet soya unu numunesinde MON 89788 miktarları çizelge 4.21’de görülmektedir.

Çizelge 4.21. Mon 89788 analiz sonuçları

Örnek No	% Mon 89788
S3	<LOQ
S6	7,09 ± 0,28

4.7 Pişirme Koşullarının Analiz Edilen % GDO Miktarına Etkilerinin Belirlenmesi

Bu kısım; farklı sıcaklık-süre uygulamalarının analiz edilen %GDO’ya etkisi, fermentasyonun etkisi ve ekmek hamuruna ilave edilen bazı katkıların %GDO üzerine etkisi olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır. Ekmek hamuruna katılan bileşenlerden GDO soya unundan gelmektedir. Kullanılan soya unu %97,19 MON40-3-2, %2,06 MON89788 içermektedir.

4.7.1 Fermentasyonun (*Saccaromices cerevisiae*) %GDO üzerine etkisi

4.7.1.1 Fermentasyonun %MON40-3-2 üzerine etkisi

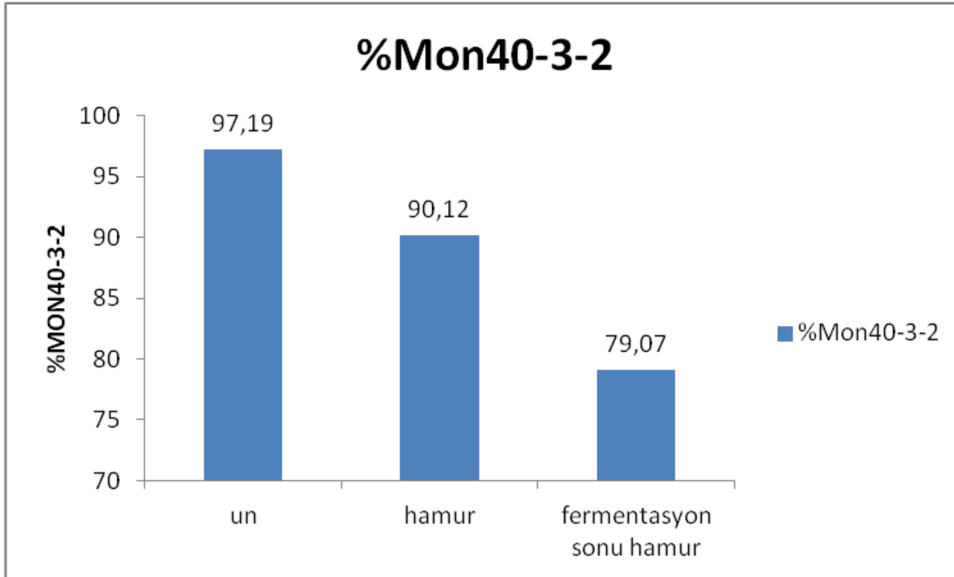
Roll ekmek yapımında kullanılan soya ununun MON40-3-2 miktarı % 97,19 olarak bulunmuştur. 10 dk elle yoğurma sonucunda % 90,12’ye düşerken, 90 dk 25°C’de fermentasyon sonucunda %79,07’e düşmüştür (Çizelde 4.22). Bu düşüşe una katılan maya tarafından üretilen DNAz enzimlerinin neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elle yoğurma aşamasında mekanik etkilerin etkili olabileceği literatürde belirtilmektedir.

Çizelge 4.22. Un, hamur ve fermentasyon sonu hamurda %MON40-3-2[a]

	%MON40-3-2
Un	97,19[a]±0,78
Hamur (10 dk yoğurma sonu)	90,12[b]±1,08
Fermentasyon sonu(90dk)	79,07[c]±2,56

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre roll ekmek yapımında kullanılan soya unu, 10 dk yoğurulan roll ekmek hamuru ve 90 dk fermentasyon sonunda analiz edilen % MON 40-3-2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05).



Şekil 4.15. Fermentasyon ile %MON 40-3-2'deki düşüş

4.7.1.2 Fermentasyonun MON89788 üzerine etkisi

Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre roll ekmek yapımında kullanılan soya unu, 10 dk yoğurulan roll ekmek hamuru ve 90 dk fermentasyon sonundaki analiz edilen % MON 89788 değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05).

Roll ekmek yapımında kullanılan soya ununun MON89788 miktarı % 2,06 olarak bulunmuştur. 10 dk elle yoğurma sonucunda % 1,70'e düşerken, 90 dk 25°C'de fermentasyon sonucunda %1,31'e düşmüştür (Şekil 4.16). Bu düşüşe una

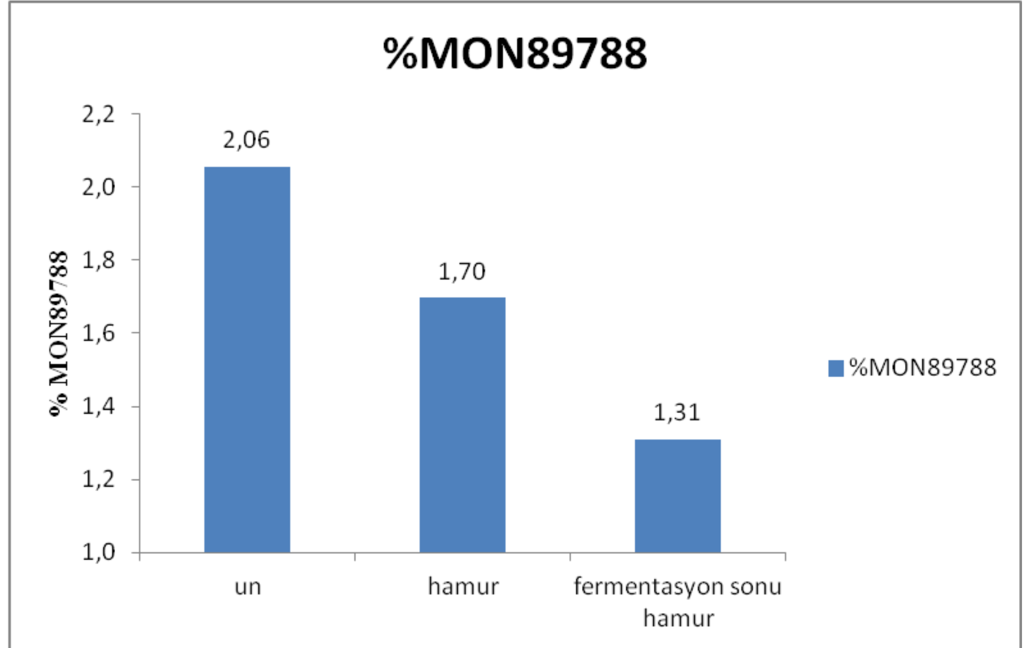
katılan maya tarafından üretilen DNAz enzimlerinin neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca elle yoğurma aşamasında mekanik etkilerin etkili olabileceği literatürde belirtilmektedir.

Çizelge 4.23. Un, hamur ve fermentasyon sonu hamurda % MON89788[a]

	%MON89788
Un	2,06[a]±0,15
Hamur (10 dk yoğurma sonu)	1,70[bc]±0,13
Fermentasyon sonu (90dk)	1,31[c]±0,27

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre roll ekmek yapımında kullanılan soya unu, 10 dk yoğurulan roll ekmek hamuru ve hamurun 90 dk fermentasyonu sonunda analiz edilen % MON89788 değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir(P<0,05).



Şekil 4. 16. Fermentasyon ile %MON89788'deki düşüş

4.7.2 Laboratuvarda farklı sıcaklık ve sürede pişirilen roll ekmeklerde yapılan analizlerin sonuçları

Üç farklı sıcaklık ve 3 farklı sürede roll ekmekler laboratuvar koşullarında etüvde pişirilmiştir. Bu örneklerde MON40-3-2, MON89788 miktar analizleri yapılmıştır.

4.7.2.1 Laboratuvarda farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde MON 40-3-2 miktar analizi

Üç farklı sıcaklık ve sürede pişirilen roll ekmeklere ait %MON 40-3-2 değerleri Çizelge 4.24'de görülmektedir. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmek örneklerinin %MON40-3-2 değerleri % 74,02- 56,66 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda roll ekmek örneklerinin %MON40-3-2 değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre roll ekmek örneklerinin %MON 40-3-2 açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.24'de görülmektedir.

Çizelge 4.24. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde %MON40-3-2 ve standart sapmaları[a]

Sıcaklık	Süre	%MON 40-3-2
220°C	10 dakika	$71,13^{a}\pm0,46$
	15 dakika	$62,00^{bc}\pm0,37$
	20 dakika	$58,30^{c}\pm0,35$
250°C	7 dakika	$67,59^{ab}\pm1,79$
	11 dakika	$60,14^{bc}\pm1,91$
	15 dakika	$61,06^{bc}\pm6,16$
280°C	5 dakika	$74,03^{a}\pm1,59$
	10 dakika	$61,66^{bc}\pm8,11$
	15 dakika	$56,67^{c}\pm1,66$

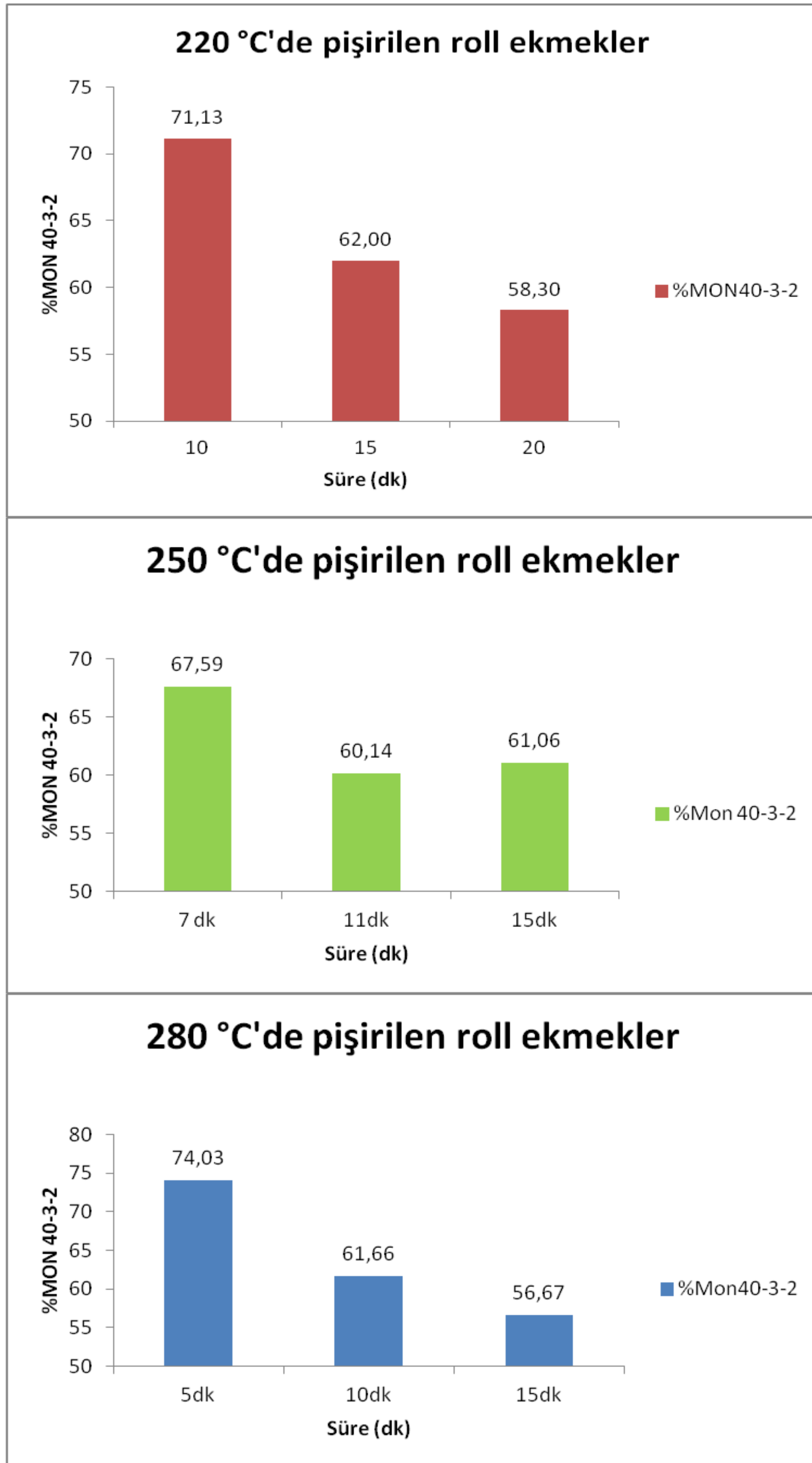
[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

Az pişmiş roll ekmeklerin 220, 250, 280°C'deki %MON40-3-2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur($P<0,05$). Orta pişmiş roll ekmeklerin 220, 250, 280°C'deki %MON40-3-2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır($P>0,05$). Çok pişmiş roll

ekmeklerde 220, 250, 280°C'deki %MON40-3-2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır($P>0,05$).

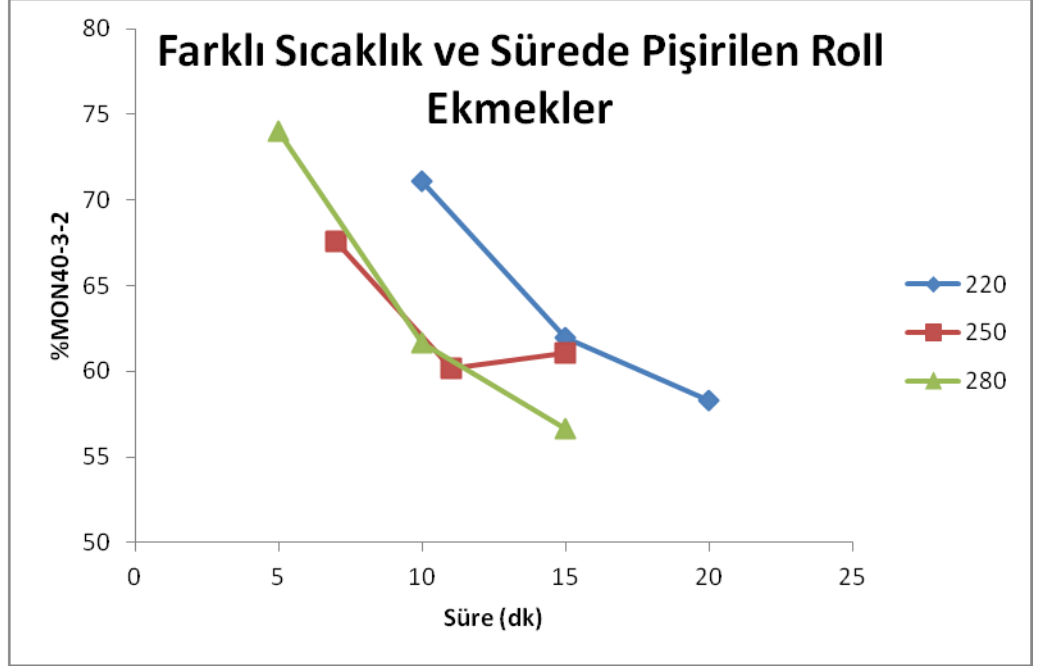
Sıcaklıklar açısından değerlendirildiğinde ise 220°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON40-3-2 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur($P<0,05$). 250°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON40-3-2 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P<0,05$). 280°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON40-3-2 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur($P<0,05$).

220°C, 250°C ve 280°C'da farklı sürelerde pişirilen roll ekmek örneklerinin ortalama %MON 40-3-2 içerikleri Çizelge 4.24'de görülmektedir.



Şekil 4.17. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmekler

Şekil 4.18'da farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerin %MON40-3-2 değerlerinin pişirme süresinin artması ile azaldığı görülmektedir. 220°C de pişirmede 250 ve 280°C'den daha yüksek %MON40-3-2 değerleri gözlenirken, 250 ve 280°C arasında büyük fark görülmemektedir.



Şekil 4.18. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde sıcaklık süre karşılaştırması

4.7.2.2 Laboratuvarda farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde MON 89788 miktar analizi

Üç farklı sıcaklık ve sürede pişirilen roll ekmeklere ait %MON 89788 değerleri Çizelge 4.25'de görülmektedir. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmek örneklerinin %MON 89788 değerleri % 1,23- 0,49 arasında bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda roll ekmek örneklerinin %MON89788 değerleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0,05$). Duncan testi sonuçlarına göre roll ekmek örneklerinin %MON 89788 açısından hangi gruba girdiği de Çizelge 4.25'de görülmektedir.

Çizelge 4.25. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde %MON89788 ve standart sapmaları[a]

Sıcaklık	Süre	%MON 89788
220°C	10 dakika	$0,95^{bc} \pm 0,06$
	15 dakika	$0,56^{e} \pm 0,08$
	20 dakika	$0,49^{e} \pm 0,08$
250°C	7 dakika	$1,05^{ab} \pm 0,11$
	11 dakika	$0,83^{cd} \pm 0,12$
	15 dakika	$0,63^{de} \pm 0,14$
280°C	5 dakika	$1,23^{a} \pm 0,05$
	10 dakika	$0,66^{de} \pm 0,05$
	15 dakika	<loq

[a]Aynı sütundaki farklı harfler Duncan testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

220°C, 250°C ve 280°C'da farklı sürelerde pişirilen roll ekmek örneklerinin ortalama %MON89788 içerikleri Çizelge 4.25'de görülmektedir.

Az pişmiş roll ekmeklerin 220, 250, 280°C'deki %MON89788 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur($P<0,05$). Orta pişmiş roll ekmeklerin 220, 250, 280°C'deki %MON89788 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır($P>0,05$). Çok pişmiş roll ekmeklerde 220, 250, 280°C'deki %MON89788 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur($P<0,05$).

Sıcaklıklar açısından değerlendirildiğinde ise 220°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON89788 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur($P<0,05$). 250°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON89788 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur($P<0,05$). 280°C'de az, orta ve çok pişirilen roll ekmeklerin %MON89788 değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur($P<0,05$).

Chen et al. (2005) soya fasulyesinden soya kıyması soya tozu ve soya sütüne işlemede; öğütme, pişirme, homojenizasyon, sterilizasyon ve spray kurutucuda kurutma gibi farklı işlemlerin endojen (lektin geni) ve exojen epsps genine etkilerini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışma farklı işleme proseslerinin exojen ve endojen gende farklı derecede etkilerinin bulunduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışması ile benzer olarak Chen et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada da endojen lektin geninin aktarılan epsps genine göre daha dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

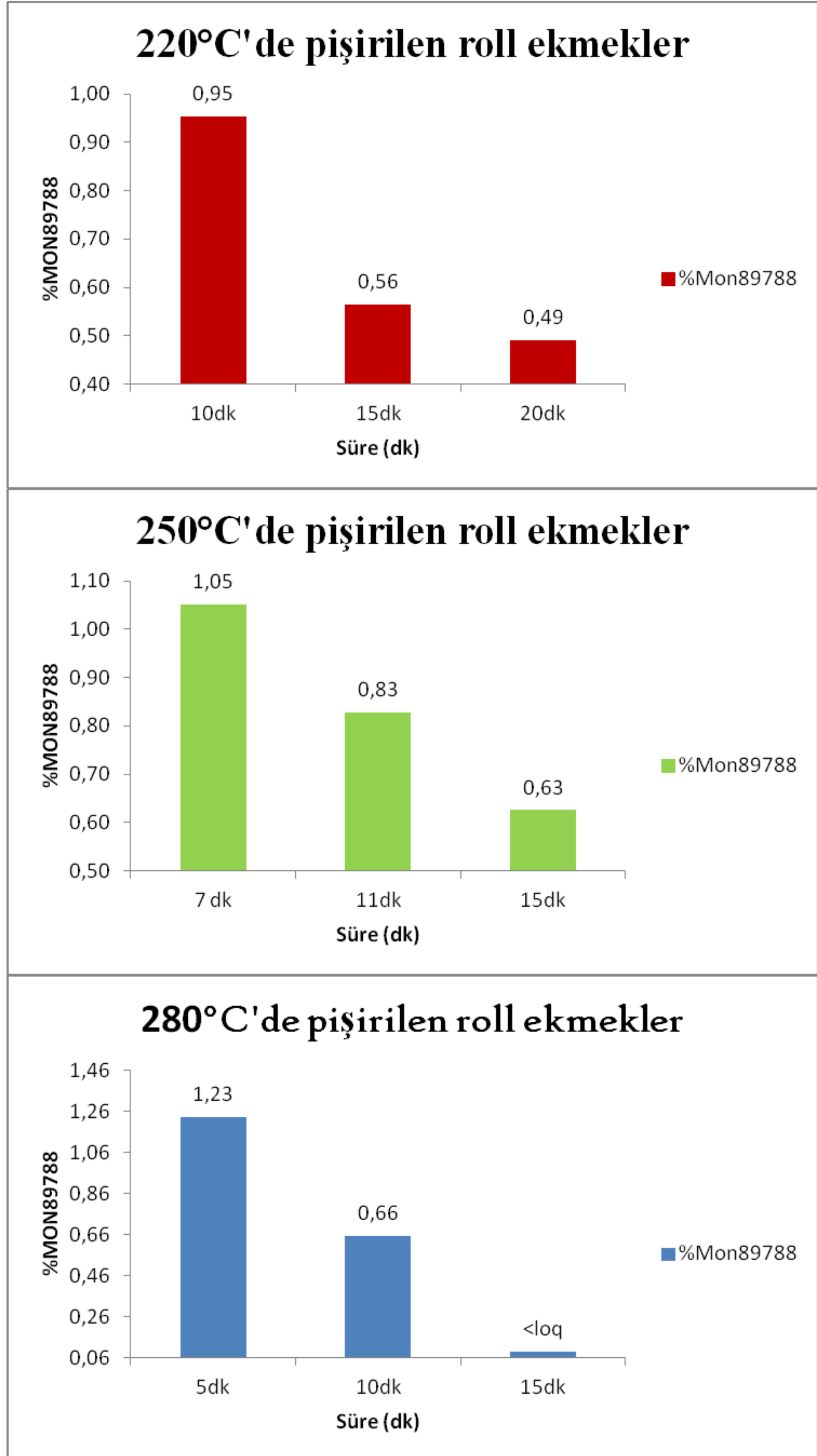
Chen et al., (2007) yaptıkları çalışmada bu tez çalışması ile benzer sonuçlara ulaşmışlar ve ısıl işlemle GDO miktarının azaldığını tespit etmişlerdir. %2,5 (w/w) RRSoyayı ham madde olarak kullanmışlar ve soya sütü işlemede kullanılan farklı işleme tekniklerinin endogenious lektin geni ve exogenious epsps geninin fragment boyutunu ve GDO miktarını nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Sonuçta farklı işleme proseslerinin endogenious ve exogenious gende farklı etkileri olduğunu belirlemişleridir. Fiziksel mekanik etkinin lektin genini 1883 bp'den 836 bp'ye düşürdüğünü, rspsp genini de 1512 bp'den 408 bp'ye düşürdüğünü görmüşlerdir. Öğütme aşamasında exogenious genin 408 bp'den 190 bp'ye düştüğü gözlenmiş ancak endogenious gen üzerinde herhangi bir etkisi olmamıştır. Endogenious ve exogenious genler aynı derecede hasara uğradığında sırasıyla 836 ve 408 bp, suruplama aşamasında 100°C'de 15 dk. açık bir etki olduğu gözlenmemiştir. Ancak 121°C'de 30s'lik sterilizasyon aşamasında endogenious gen 836 dan 162 bp'de degrede olmuştur. Homojenizasyon aşaması endogenious ve exogenious gen üzerinde şuruplama aşaması gibi aynı etkiyi göstermiştir. Mekanik parçalama ve şuruplama aşamaları exogenious geni büyük oranda hasara uğratmış ve GDO miktarı sırasıyla 2,5'tan %1,656 ve %0,435'e düşmüştür. Endogenious gen öğütme ve homojenizasyon aşamalarında hasara uğramazken exogenious gen belirgin olarak hasara uğramıştır. Bu sebeple transgenik miktarı homojenizasyon aşamasında da düşmeye devam etmiş ve homojenizasyon sonrası %0,377'ye ulaşmıştır. Son olarak sterilizasyon aşamasında endogenios gen exogenious genden daha fazla hasar görmüş ve son üründe transgenik miktarı %0,58 olarak bulunmuştur.

Bergerova et al. (2009) ise bu çalışmadan farklı olarak GDO miktarının ısıl işlemden etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada deneysel olarak ısıl işleme tabi tutulmuş gıdalarda (ekmek ve soya unu) DNA hasarı ve transgenik miktarının nasıl değiştiğini incelemişlerdir. DNA hasarı agaroz jel elektroforezi ve polimerize zincir reaksiyonu ile (PCR) incelenmiştir. Cetiltrimetil amonyum bromür metodu Genespin ve Wizard'a göre daha iyi DNA verimi vermiştir. 220°C'de pişirme DNA fragment ölçüsünü azaltmıştır. Amplifiye olabilir DNA boyunu belirlemek için soya ve mısır geni için primerler kullanılmıştır. 100-200 bp'lik kısa fragmentler tüm örneklerde amplifiye olmuştur. 1 kbp'in üzerindeki DNA fragmentleri sadece 220°C'de 30 dk ısıtmada amplifiye olabilmiştir. Unun

220°C'de 30 dk ısıl işleme maruz kalması ekstrakte edilen DNA fragmentlerini boyunu azaltmış ve 1100 bp'lik amplikon amplifiye olamamıştır ancak ekmekte 913 ve 1100 bp'lik amplikonlar elde edilebilmiştir. Mısır için de aynı işlemler zein genini baz alarak aynı koşullarda incelenmiştir. 220°C'de 45 dk süreyle fırında pişirilen ekmeklerde %MON40-3-2 miktarında önemli bir değişiklik olmamıştır.

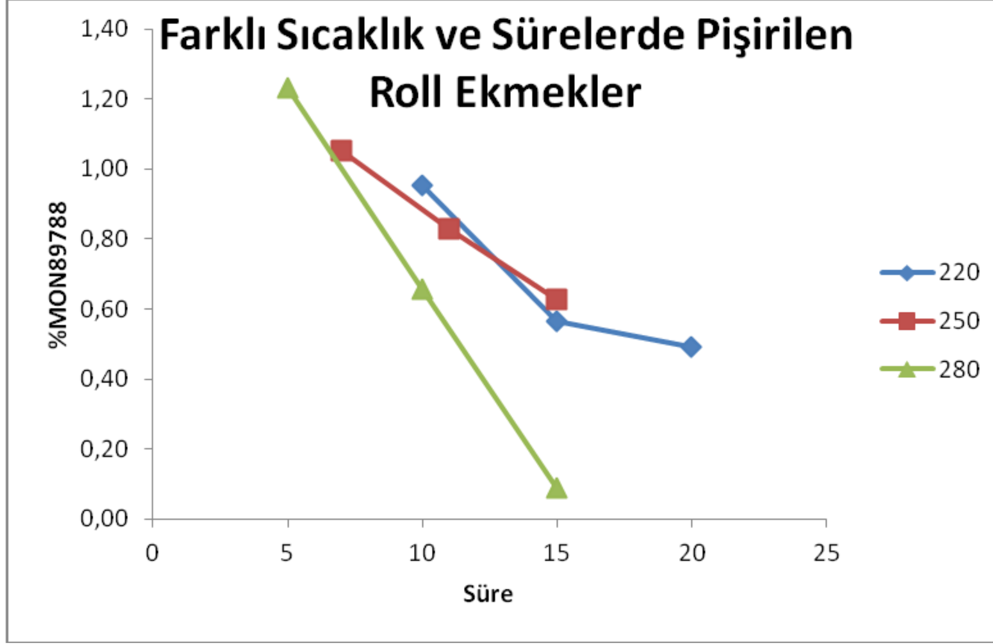
Bu tez çalışmasında Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı tarafından 14 ülkedeki Referans Laboratuvarların katılımıyla validasyon çalışması tamamlanan ve yayımlanan yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemler Bergerova (2009) ve Chen (2005) ve (2007)'deki yöntemlerden gerek termal profil gerekse kullanılan primer ve problar bakımından farklılık göstermektedir.

220°C, 250°C ve 280°C'da farklı sürelerde pişirilen roll ekmek örneklerinin ortalama %MON 89788 içerikleri Şekil 4.19'de görülmektedir.



Şekil 4.19. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde MON89788

Şekil 4.20'de farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerin %MON89788 değerlerinin pişirme süresinin artması ile azaldığı görülmektedir. Sıcaklıklar karşılaştırıldığında 280°C'de pişirilen roll ekmeklerde %MON89788 değerleri daha düşük görülmektedir.



Şekil 4.20. Farklı sıcaklık ve sürelerde pişirilen roll ekmeklerde sıcaklık süre karşılaştırması

4.7.3 Katkı maddeleri ve diğer parametrelerin etkisi

% GDO miktarındaki değişimi gözlemeye yönelik çalışmalar kapsamında, roll ekmek hamuruna Çizelge 4.26'da gösterilen maddeler katılmış, 250°C'de 11 dk pişirilmiştir. Ancak farklı katkı maddeleri ve baharatlar ilave edilen roll ekmeklerin %GDO değerlerinde, kontrol örneğine göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (P>0,05).

Çizelge 4.26. Roll ekmek hamuruna katılan farklı maddeler ve %GDO değerleri

Etkisi Araştırılan Etken Madde Uygulanma şekli/ süresi/miktarı	**%MON40-3-2**	**%MON89788**
Standart koşullarda pişirilen roll ekmek **(250°C'de 11 dk)**	60,14±1,91	0,83±0,11
Maya miktarı %50 arttırılmış	57,39±2,69	0,82±0,02
Fermentasyon Sıcaklığı 40°C	59,92±0,81	0,70±0,13
KCl (NaCl %50 oranında azaltılmış, yerine aynı oranda KCl ilave edilmiştir)	64,08±2,12	0,68±0,06
Sitrik Asit (0,1g)	59,33±5,46	0,65±0,06
Askorbik Asit (0,5g)	62,64±0,37	0,84±0,14
Sarımsak (6 g)	58,78±3,84	0,55±0,01
Ekşi hamur (20g)	58,63±2,37	0,68±0,13
Zencefil (1,5g)	57,77±0,38	0,74±0,12
Keçiboynuzu (1,5g)	61,39±4,65	0,84±0,09
Kekik (1,5 g)	61,98±3,77	0,70±0,12
Kalsyum Propiyonat (3000ppm)	66,95±7,40	0,75±0,08
SO_2 (0,1 g)	56,56±3,66	0,62±0,11

5. SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında soyaya ait üç gen bölgesinde verifikasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. MON 40-3-2 için LOQ %0,06, LOD %0,06; MON89788 için LOQ %0,07, LOD%0,07; A2704-12 için LOQ %0,02, LOD %0,02 olarak bulunmuştur.

20'şer adet soyalı mantı, soya unu, bisküvi numunesinden CTAB, Qiagen Mericon ve Eurofins GeneScan yöntemleri ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Sonuçlar DNA saflığı ve konsantrasyonu yönünden değerlendirilmiştir.

CTAB ve Qiagen yöntemleri ile izole edile mantı örneklerinin ortalama DNA konsantrasyonları sırası ile 65,46 ve 69,37 ng/µl bulunurken, Eurofins ile 43,66 ng/µl bulunmuştur. Konsantrasyon açısından değerlendiriliğinde CTAB ve Qiagen yöntemlerinin izolasyon verimlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Eurofins ve Qiagen ile izole edilen DNA'ların ortalama saflık değerleri sırası ile 1,76 ve 1,85 olarak bulunmuştur. CTAB yöntemi ile izole edile mantı örneklerinin DNA saflık ortalaması 1,83 ile ideal saflık olan 1,8'e en yakın değerdir, bu yöntemin gerek konsantrasyon gerekse saflık yönünden değerlendirildiğinde mantı için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir.

Üç izolasyon yöntemi arasında; bisküvi örneklerinin DNA konsantrasyonları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P>0,05$).

Üç yönteme ait DNA konsantrasyon ortalamaları; Eurofins için 1,81, Qiagen için 1,86, CTAB için 1,88 olarak bulunmuştur. Bisküvi için en uygun izolasyon yönteminin Eurofins olduğu söylenebilir.

CTAB ve Qiagen yöntemleri ile izole edile soya unu örneklerinin ortalama DNA konsantrasyonları sırası ile 44,87 ve 58,05 ng/µl bulunurken, Eurofins ile 77,13 ng/µl bulunmuştur. Konsantrasyon açısından değerlendiriliğinde Eurofins yönteminin izolasyon veriminin daha yüksek olduğu görülmektedir ve soya unu için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir.

Eurofins ve Qiagen ile izole edilen soya ununa ait DNA'ların ortalama saflık değerleri sırası ile 1,79 ve 1,84 olarak bulunmuştur. CTAB yöntemi ile izole edile soya unu örneklerinin DNA saflık ortalaması 1,08 olarak bulunmuştur ve bu

yöntem ile izole edilen DNA'lardan proteinlerin uzaklaştırılamadığı tespit edilmiş ve bu yöntem soya ununa uygun bulunmamıştır. Eurofins ile izole edilen örneklerin DNA saflık ortalaması 1,79 ile ideal saflık olan 1,8'e en yakın değerdir, bu yöntemin gerek konsantrasyon gerekse saflık yönünden değerlendirildiğinde soya unu için en uygun yöntem olduğu söylenilebilir. Bu nedenle pişirme denemelerindeki örneklerin DNA izolasyonları Eurofins Gene Spin yöntemi ile yapılmıştır.

Üç farklı yöntemle izole edilen DNA'ların saflığı ve konsantrasyonu Agaroz Jel elektroforezinde görüntülenmiştir. CTAB yöntemi ile soya unundan DNA izole edilememiştir. Qiagen Mericon ve Eurofins Gene Spin yöntemleri ile yüksek kalitede DNA elde edilmiştir. Soyalı mantı ve bisküvi numuneleri ısıl işlem gördüğü için jelde hasarlı DNA görüntüsü vermişlerdir.

Piyasadan rasgele temin edilen 60 adet numunede GDO tarama analizleri Eurofins Gene Scan kiti ile yapılmıştır. 20 adet bisküvinin hiçbirinde GDO "Tespit Edilmemiş", 20 adet soyalı mantı numunesinin iki tanesinde 35S ve NOS promotörleri tespit edilmiş, soya unu numunelerinin 5 tanesinde "35S, NOS", 2 tanesinde de "35S, NOS, FMV Tespit Edilmiş"tir. GDO pozitif mantı numunelerinin verifikasyonu yapılan CRL yöntemleri ile ident analizlerinde örneklerin ikisinde de MON40-3-2 gen bölgesi tespit edilmiştir. Soya unu numunelerinden 5 tanesinde MON40-3-2, 2 tanesinde MON40-3-2 ve MON89788 gen bölgeleri birlikte tespit edilmiştir. Soyalı mantı numunelerinde %MON40-3-2 miktarı verifikasyonu yapılan CRL yöntemine göre yapılmış ve LOQ altında bulunmuştur. Soya unu numunelerinin 4 tanesinde MON40-3-2 miktarı LOQ altında, 3 tanesinde ise %0,82 ile %69,87 arasında değerler bulunmuştur. Soya unu numunelerinde MON89788 miktarı birinde LOQ'den küçük bulunurken diğer numunede %7,09 olarak bulunmuştur.

Tez projesinin ikinci kısmında formulasyonunda %97,19 MON40-3-2 ve %2,06 89788 içeren soya unu kullanılarak yapılan roll ekmekler laboratuvarda etüvde pişirilmiştir. Farklı pişirme koşullarının %GDO üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu kısım kendi içinde 3 başlık altında incelenmiştir.

İlk olarak fermentasyonun %MO40-3-2 ve %MON89788 üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde yoğurmanın sonunda ve fermentasyon sonunda yapılan analizler ile analiz edilen GDO miktarının düştüğü görülmüştür. Bu düşüşün maya tarafından üretilen DNAz enzimleri nedeni ile olduğu düşünülmektedir. %GDO

Trans gen/referans gen*100 şeklinde hesaplandığı için, soyaya ait lektin referans geninin aktarılan MON40-3-2 ve MON89788 genlerine göre DNAz enzimlerine karşı daha dayanıklı olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde soya unu, elde yoğurma sonunda hamurda ve fermentasyon sonu hamurdaki GDO oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir($P<0,05$).

İkinci olarak roll ekmekler 220°C, 250°C ve 280°C'de az pişmiş, orta pişmiş ve çok pişmiş olarak üç farklı sürede pişirilmiştir. Pişirme ile analiz edilen %MON40-3-2 ve %MON89788 miktarının düştüğü gözlenmiştir. Pişirme öncesi hamurda % 79,07 MON40-3-2 tespit edilirken en yüksek derecede pişme ile MON40-3-2 oranı %56,67'ya kadar düşmüştür. MON89788 gen bölgesi de pişirme öncesi %1,31 iken yüksek derece ve sürede pişirme ile LOQ altına düşmüştür.

Son olarak ekmek üretiminde antimikrobiyal olarak kullanılan kalsyum propiyonat ve SO_2 ilavesinin, ekmeğe duyusal olarak yakışan ve fonksiyonellik katabileceği düşünülen, kekik, zencefil, keçiboynuzu ve sarımsak ilavesinin, kullanılan NaCl miktarını azaltmaya yönelik KCl ilavesinin, ekmekçilikte dokuyu iyileştirmek için kullanılan askorbik asit ve sitrik asit ilavesinin, maya miktarını arttırmanın, fermentasyon sıcaklığını yükseltmenin analiz edilen %MON40-3-2 ve %MON89788 üzerine etkisi 250°C'de 11 dk pişirme koşulu sabitlenerek karşılaştırılmıştır ancak istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0,05$).

Gıdalarda GDO için ülkemizde de bulaşan limiti getirilmesi düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile ısıl işlem görmüş gıdalarda analiz edilen GDO miktarının sıcaklık ve süreye bağlı olarak azaldığı tespit edilmiş, bu da özellikle düşük oranda GDO içeren gıdalar için göz önünde bulundurulması gereken bir veri olmuştur. Çünkü bu çalışma ile başlangıçta %2,06 olan MON89788 gen bölgesi pişirme ile LOQ altı seviyesine düştüğü belirlenmiştir.

Aynı zamanda Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğünün (TAGEM) bir projesi olarak da yürütülen bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü için veri teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aharoni, A. and Vorst O., 2001, DNA microarrays for functional plant genomics, *Plant Molecular Biology,* 41:99-118 pp.

Ahmed, F.E., 2002, Detection of genetically modified organisms in foods, *Trends in Biotechnology,* 5:215-223 pp.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D., 1983, Molecular biology of the cell, Garland Publishing, NewYork.

Anonymus, 2001, Harvest on the Horizon: Future Issues of the Agricultural Biotechnology. http://pewagbiotech.org/research/harvest/725k.pdf (Erişim tarihi: 2 Nisan 2013)

Anonymus, 2007a., Event spesific method for the quantification of soybean line MON 40-3-2 using Real-Time PCR: Validation report, (Erişim tarihi 11.09.2007).

Anonymus, 2007b., Event spesific method for the quantification of soybean line A 2704-12 using Real-Time PCR: Validation report, (Erişim tarihi 14.05.2007)

Anonymus, 2007c., Event spesific method for the quantification of soybean line A 2704-12 using Real-Time PCR: Protocol, (Erişim tarihi 14.05.2007)

Anonymus,2007d.,http://agsearch.snu.ac.kr/haksul/seminar/pds/2004_symposium /pdf/Article_KimHaeYeo ng.pdf (Erişim tarihi 10.04.2007)

Anonymus, 2008a., Event spesific method for the quantification of soybean line MON 89788 using Real-Time PCR: Validation report, (Erişim tarihi 18.02.2008)

Anonymus, 2008b., Event spesific method for the quantification of soybean line MON 89788 using Real-Time PCR: Protocol, (Erişim tarihi: 18.02.2008)

Anonymous, 2009., Event spesific method for the quantification of soybean line MON 40-3-2 using Real-Time PCR: Protocol, (Erişim tarihi: 20.01.2009).

Anonymous, 2010a., Biyogüvenlik Kanunu, 26 Mart 2010 tarihli Resmi Gazete, Sayı: 27533 (Erişim tarihi 03.06. 2014).

Anonymous, 2010b., Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünlerine Dair Yönetmelik, 13 Ağustos 2010 tarihli Resmi Gazete, Sayı: 27671 (Erişim tarihi: 03.06.2014).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anonymous, 2011a., Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods (Erişim tarihi: 04.05.2013).

Anonymous, 2011b., Biyogüvenlik Kurul Kararları. 26 Ocak 2011 tarihli Resmi Gazete. Sayı: 27827 (Erişim tarihi: 04.05.2013).

Anonymous, 2014., Biyogüvenlik Kurulu'na Sunulmak Üzere Sosyo-ekonomik Değerlendirme Komitesi Tarafından Hazırlanan Rapor http://www.tbbdm.gov.tr/Files/arsiv/gida/soya/sosyo/MON%2040-3-2.pdf (Erişim tarihi: 03.06.2014)

Arne, H.J., Yves, B., Marc, de L., Lutz, G., Sandrine, H., Lotte, H., Dany, M., Sven, P., Maria, P., Marc, V., B. and Doerte, W., 2012, Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials, Biotechnology Advances, 30:1318–1335pp.

Arun, Ö. Ö., Yılmaz, F., Muratoglu, K., 2013, PCR detection of genetically modified maize and soy in mildly and highly processed foods, *Food Control*, 32, 525-531pp.

Aslan, D., 2011, Halk sağlığı bakış açısı ve genetiği değiştirilmiş organizmalar, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 42:110-114 pp.

Babaoğlu, M., 1999, Bitkilerde gen transferi teknikleri, *Ziraat Yüksek Mühendisleri Birliği Dergisi*, 322:24-26pp.

Bai, S., Zhang, J., Li S., Chen, H., Terzaghi, W., Zhang, X., Chi, X., Tian, J., Luo, H., Huang, W., Chen, Y. and Zhang, Y., 2010, Detection of Six Genetically Modified Maize Lines Using Optical Thin-Film Biosensor Chips, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 58, 8490–8494pp.

Bauer, T., Weller, P., Hammes, W.P. and Hertel, C., 2003, The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology*, 217(4):338–343pp.

Bauer, T., Hammes, W.P., Haase, N.U. and Hertel, C., 2004, Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environmental Biosafety Reserch*, 3:215–223pp.

Bergerová, E., Hrnčírová, Z., Stankovská, M., Lopašovská, M. and Siekel, P., 2010, Effect of Thermal Treatment on the Amplification and Quantification of Transgenic and Non-transgenic Soybean and Maize DNA, Food Analytical Methods, 3:211–218pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bellocchi, G., Giacomo, M., Foti, N., Mazzara, M., Palmaccio, E., Savini1, C.,

Domenicantonio, C., Onori, R. and Eede, G., V., 2010, Testing the interaction between analytical modules: an example with Roundup Ready® soybean line GTS 40-3-2, *BMC Biotechnology*, 10:55.

Brod, F.C.A. and Arisi, A.C.M., 2007, Recombinant DNA in meat additives: specific detection of Roundup Ready soybean by nested PCR, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87:1980–1984pp.

Browning, D. F. And Busby, S. J., 2004, The regulation of bacterial transcription initiation, *Nature Reviews Microbiology*, 2:57-65pp.

Chaouachi, M., Be´rard, A. And Said, K., 2013, Relative quantification in seed GMO analysis: state of art and bottlenecks, *Transgenic Reserch*, 22:461–476pp.

Chen, Y., Wang, Y., Ge, Y.Q., Xu, B.L., 2005, Degradation of endogenous and exogenous genes of Roundup-Ready soybean during food processing, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53(26):10239–10243pp.

Chen, Y., Ge, Y.Q. and Wang, Y., 2007, Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of Roundup Ready Soybean, *European Food Reserch and Technology*, 225(1):119–126pp.

Çelik, V. Ve Turgut-Balık, D., 2007, Genetiği değiştirilmiş organizmalar, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 23 (1-2) 13 –23ss.

Çevik, M. Ş., 2005, Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3-9ss.

Debode, F., Janssen, E. and Berben, G., 2007, Physical degradation of genomic DNA of soybean flours does not impair relative quantification of its transgenic content, *European Food Research and Technology*, 226:273–280pp.

Deisingh, A. K. and Badrie, N., 2005, Detection approaches for genetically modified organisms in foods, *Food Research International*, 38, 639-649pp.

Demir., A., Seyis, F. ve Kurt, O., 2006, Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar: 1. Bitkiler, *OMU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(2): 249-260ss.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dijk, J. P. V., Leifert, C., Barros, E. and Kok, E. J., 2010, Gene expression profiling for food safety assessment: Examples in potato and maize, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, 21-25pp.

Dneasy mericon Food Handbook, 2010, For extraction of total nucleic acids from a range of food sample types, Qiagen, 1-30pp.

Duggan, D.J., Bittner, M., Chenv, Meltzer, P., and Trent, J. M., 1999, Expression profiling using cDNA microarrays. Nature Gen. Suppl. 21, 10-14pp.

EFSA Journal, 2007, Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSA-GMO-NL-2005-18) for the placing on the market of the glufosinate tolerant soybean A2704-12, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC), 524, 1-22pp.

EFSA Journal, 2008, Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on application (reference EFSA-GMO-NL-2006-36) for the placing on the market of the glyphosate tolerant genetically modified soybean MON89788, for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto, The EFSA Journal, 758, 1-23pp.

Eickhoff, H., Schneider, U., Nordhoff, E., Nyarsik, L., Zehetner, G., Nietfeld, W. and Lehrach H., 2002, Technology Development for DNA Chips. Eds; Grigorenko EV. In. DNA Arrays Technologies and Experimental Strategies. 2nd Ed, United States of America: CRC Press, 1-9.

Elenis, D. S., Kalogianni, D. P., Glynou, K., Ioannou, P. C. and Christopoulos, T. K., 2008, Advances in molecular techniques for the detection and quantification of genetically modified organisms, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392:347-354pp.

Eurofins GeneSpin Catalogue, 2011, Kit for isolation of high-quality DNA from food, feed and bacteria, Cat. No. 522440605, 1-25pp.

Finkel, E., 1999, Australian Center Develops Tools for the Developing World Science, 285: 1481-1482pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Forbes, J.M., Blair, G.E., Chiter, A. and Perks, S., 1998, Effect of feed processing conditions on DNA fragmentation., Final report on CS0116 to the ACNFP, 19p

Gryson, N., Dewettinck, K. and Messens, K., 2007, Detection of genetically modified soy in doughs and cookies, *Cereal Chemistry*, 84(2):109–115pp.

Gryson, N., Messens, K. and Dewettinck, K., 2008, PCR detection of soy ingredients in bread, *European Food Research and Technology*, 227:345–351pp.

Gryson, N., 2010, Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review, *Analytical and Bioanalatical Chemistry*, 396:2003–2022pp.

Hansen, G. and Wright, M. S., 1999, Recent advances in the transformation of plants, *Trends in Plant Science*, 4: 226-231pp.

Haspolat, I., 2012, Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve biyogüvenlik, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 59, 75-80pp.

Haugland, R.P., 2002, The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Ninth Edition. Molecular Probes, Inc. http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The- Handbook.html (Erişim tarihi:10 Mayıs 2012)

Hemmer, W., 1997, Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods, Biosafety Research and Assesment of Tehnology Impacts of the Swiss Priority Program Biotechnology-Report 2/97, 61 p. http://www.bats.ch/bats/publikationen/1997-2_gmo/index.php(Erişim tarihi: 3 Mayıs, 2014).

Henzi, M. X., Christey, M. L. and McNeil, D. L., 2000, Factors that influence Agrobacterium rhizogenes mediated transformation of broccoli (Brassica oleracea L. var. italica), *Plant Cell Reports*, 19: 994-999pp.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, Biotechnology 10, 413–417pp.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R., 1993, Kinetic PCR: Real-time monitoring of DNA amplification reactions, *Biotechnology 11*, 1026–1030pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Holst-Jensen, A., De Loose, M. and Van den Eede, G., 2006, Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54:2799–2809pp.

Hoshida, H., Tanaka, Y., Hibino, T., Hayashi, Y., Tanaka, A., Takabe, T. and T. A. Takabe., 2000, Enhanced Tolerance to Salt Stres in Transgenic Rice that Overexpresses Chloroplast Glutamine Synthetase, *Plant Molecular Biology*, 43: 103-111pp.

Hotzel, H., Müller, W. and Sachse, K., 1999, Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients, *European Food Research Technology*, 209, 192-196pp.

Hrncirova, Z., Bergerova, E. and Siekel, P., 2008, Effects of technological treatment on DNA degradation in selected food matrices of plant origin, *Journal of Food and Nutrition Research*, 47(1):23–28pp.

Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K. and Engel, K.H., 1998, Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction, Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A 206, 203-207pp.

Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Moreano, F. and Engel, K., H., 2000, PCR-based quantification of genetically modified Bt maize: single-competitive versus dual-competitive approach, *European Food Research and Technology*, 212(1):95–99pp.

ISAAA., 2013, Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/executivesummary/default.asp (Erişim tarihi: 05.05.2014).

Jeng, S.T., Shyu, Y.T. and Pan, T.M., 2003, Detection of genetically modified soybeans in processed food, Food and Fertilizer Technology Center, Tech Bull 161:10.

Kakihara, Y., Matsufuji, H., Chino, M. And Yamagata, K., 2007, Detection of recombinant DNA of genetically modified (GM) soybeans in heat-treated GM soybeans and commercial natto, *Food Control*, 18(10):1289–1294pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kaur, J., Radu, S., Ghazali, F.M. and Kqueen, C. Y., 2010, Real-time PCR-based detection and quantification of genetically modified maize in processed feeds commercialised in Malaysia, *Food Control*, 21: 1536–1544pp.

Kharazmi, M., Bauer, T., Hammes, W. P. And Hertel, C., 2003, Effect of food processing on the fate of DNA with regard to degradation and transformation capability in Bacillus subtilis, *Systematic and Applied Microbiology*, 26(4):495–501pp.

Kok, E.J., Kleter G.A. and Dijk J.P., 2003, Use of the cDNA microarray technology in the safety assessment of GM food plants, Nordic Council of Ministers, Copenhagen.

Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B. and Hedgpeth, J., 2000, 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures, *Nucleic Acids Research*, 28, 655-661pp.

Lindahl, T., 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, 362(6422):709–715pp.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., and Anklam,E., 1999, IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder, *Journal of AOAC International*, 82: 923-928pp.

Lipp, M., Anklam, E. and Stave, J.W., 2000, Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials, *Journal of AOAC International*, 83: 919-927pp.

Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G. and Anklam, E., 2001, Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs, *European Food Research Technology*, 212, 497-504pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Longstaff, M., Edmonds, H.S. and Newell, C.A., 1995, An improved method for the detection and quantification of recombinant protein in transgenic plants, Plant Molecular Biology Reporter 13, 363-368pp.

Matsuoka, T., Kuribara, H., Takubo, K., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M. and Hino, A., 2002, Detection of recombinant DNA segments introduced to genetically modified maize (Zea mays), *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 2100-2109pp.

Melchers, L. S., and M. H. Stuiver., 2000, Novel Genes for Diseases Resistance Breeding, *Current Opinion in Plant Biology*, 3:147-152pp.

Meyer, R. and Candrian, U., 1996, PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components, Lebensm Wiss Technology, 29:1–9pp.

Meyer, R. and Jaccaud, E., 1997, Detection of genetically modified soya in processed food products: Development and validation of PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans, Amadò, R. Battaglia (Eds.), Proceedings of the ninth European conference on food chemistry (Vol. 1). Authenticity and adulteration of food-the analytical approach. 24-26 September 1997. Interlaken 1, 23-28. ISBN: 3-9521414-0-2.

Mohapatra, U., Mccabe, M.S., Power, J.B., Schepers, F Vanderrarend, A., and Davey, M.R., 1999, Expression of the bar gene confers herbicide resistance in transgenic lettuce, *Transgenic Research*, 8, 33-44pp.

Monsanto Company, 2000, Updated Molecular Characterization and safety Assessment of Roundup Ready Soybean Event 40-3-2, Monsanto Report, Product Safety Centre.

Moody, E.D., 2001, Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression, *Journal of Animal Science*, 79, 128-135pp.

Murray, S. R., Butler, R.C., Hardacre, A.K. and Timmerman-Vaughan, G.M., 2007, Use of quantitative real-time PCR to estimate maize endogenous DNA degradation after cooking and extrusion or in food products, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55:2231–2239pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Murray, S.R., Butler, R.C. and Timmerman-Vaughan, G.M., 2009, Quantitative real-time PCR assays to detect DNA degradation in soy-based food products, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(7):1137–1144pp.

Ogasawara, T., Arakawa, F., Akiyama, H., Goda, Y. and Ozeki, Y., 2003, Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans, *Japanese Journal of Food Chemistry*, 10(3):155–160pp.

Okumuş, A. ve Öner, F., 2012, Mısır Bitkisinde GD Analizi Teknolojisi, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 5 (2): 25-28pp.

Öktem, H. A., 2001, Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkilerin Geliştirilmesi, Bitki Biyoteknolojisi: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, *Selçuk Üniversitesi Vakfi Yayınları*, Bölüm 18.

Özkaralı, E., 2007, β- Talasemi Moleküler Tanısında Klasik Yöntemlerle Mikroarray Yönteminin Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biokimya Anabilim Dalı.

Özcan S. ve Özgen M., 1996, Bitki genetik mühendisliği. Genetic engineering of crop plants, Kükem Dergisi, (1): 69-95ss.

Pan, T.M. and Shih, T.W., 2003, Detection of genetically modified soybeans in miso by polymerase chain reaction and nested polymerase chain reaction, *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(2):154–158pp.

Poms, R.E., Glössl, J. and Foissy, H., 2001, Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat, *European Food Research Technology*, 213, 361-365pp.

Roussel, S.A. and Cagdill, R.P., 2004, Testing of Genetically Modified Organisms in Foods, (Ed. Ahmed, F. E.,) Food Products Press An Imprint of The Haworth Press, Inc. New York - London -Oxford.

Saraçlı, M.A., 2007, DNA Chip Teknolojisi ve Mikolojide Uygulama Alanları, Sempozyum: Mikozlar ve moleküler yöntemler,181-184ss.

Schena M. and Davis R.W., 2001, Genes, Genomes, and Chips. Eds; Schena M. In. DNA Microarrays A Practical Approach., New York: Oxford University Press, 1-16pp.

Spielbauer, B., and Stahl, F., 2005, Impact of microarray technology in nutrition and food research, *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 908-917pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Stear, C.A., 1990, Handbook of Bread Making Technology, Elsevier Science Publishers Ltd., England, 41-42pp.

Somma, M., Querci, M., Jermini, M. And Van den Eede, G., 2004, Extraction and purification of DNA, In The analysis of food samples for the presence of genetically, modified organisms, European commission, Joint research centre, special publication 1.03.114, Session 4.

Sambrook, J. and Russel, D., 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Smith, D.S. and Maxwell, P. W., 2007, Use of quantitative PCR to evaluate several methods for extracting DNA from corn flour and cornstarch, *Food Control*, 18:236–242pp.

Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J. and Brown, T., 2000, Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucleic Acids Research*, 28, 3752-3761pp.

Tilley, M., 2004, PCR amplification of wheat sequences from DNA extracted during milling and baking, *Cereal Chemistry*, 81 (1):44–47pp.

Tyagi, S. and Kramer, F.R., 1996, Molecular Beacons: Probes that fluoresce upon hybridisation, *Nature Biotechnology*, 14, 303-308pp.

Querci, M.,, Jermini, M., and Eede, G., V., 2006. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically modified organisms, Office for Official Publications of the European Communities.

Querci, M., Bulcke, M. V. D., Žel, J., Eede, G. V. D. and Broll, H., 2010, New approaches in GMO detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396:1991-2002pp.

Quirasco, M., Schoel, B., Plasencia, J., Fagan, J. and Galvez, A., 2004, Suitability of real-time quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: Fate of DNA and protein after alkaline cooking, *Journal of AOAC International*, 87(3):639–646pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wagner, D.B., Furnier, G.R., Saghay-Maroof, M.A., Williams, S.M., Dancik, B.P. and Allard, R.W., 1987, Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids, Proceedings of the National Academy of Science USA, 84, 2097–2100pp.

Wang, J., 2000, From DNA biosensors to gene chips. Detection of Genetically Modified Crops by Combination of Multiplex PCR and Low-density DNA Microarray, *Nucleic Acids Research*, 28:16, 3011-3016pp.

Weighardt, F., 2006, Quantitative PCR for GMO Detection, Office for Official Publications of the European Communities, 175-193pp.

Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E. and De Loose, M., 2001, Characterization of the Roundup Ready soybean insert, *European Food Research Technology*, 213, 107-112pp.

Woods, C., 1999, UF Biotech Breakthrough: Alga Gene Boosts Crop Yields, http://www.napa.ufl. edu/99news/alga.htm

Vijayakumar, K.R., Martin, A., Gowda, L.R. and Prakash, V., 2009, Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing, *Food Chemistry*, 117:514–521pp.

Xu, W. T., Zhang, N., Luo, Y., B., Zhai, F. Z., Shang, Y., Yan, X. H., Zheng, J. J. and Huang, K. L., 2011, Establishment and evaluation of event-specific qualitative and quantitative PCR method for genetically modified soybean DP-356043-5, *European Food Research and Technology*, 233:685–695pp.

Ye, X., Al -Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I., 2000, Engineering Provitamin A (b-carotene) Biosynthetic Pathway Into (carotenoid-free) Rece Endosperm, Science, 287: 303-305pp.

Zimmermann, A., Lüthy, J. and Pauli, U., 1998, Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung, A 207, 81–90pp.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kırcaali-Bulgaristan'da doğmuş; ilk, orta ve lise eğitimini İzmir'de tamamlamıştır. 1999-2003 yılları arasında Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bülümünde lisans öğrenimini tamamlamıştır. 2010 yılında Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında yüksek lisans öğrenimi tamamlamıştır. 2002 yılında stajını IAESTE aracılığıyla burslu olarak Queen's University Belfast'da tamamlamıştır. 2004-2005 yılları arası Figsan Dış Ticaret Ltd. Şti'de çalışmış, 2005 yılında KPSS ile Tarım Bakanlığı Kütahya İl Tarım Müdürlüğü'ne atanmış, 2007'de İzmir İl Kontrol Laboratuar Müdürlüğü'ne tayin olmuş ve halen bu kurumda çalışmaya devam etmektedir. Doktora öğrenimine Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalında 2010 yılında başlamıştır.

EKLER

Ek 1 Laboratuvarda pişirilen roll ekmekler

EK-1. LABORATUVARDA PİŞİRİLEN ROLL EKMEKLER

220°C’de roll ekmekler 10, 15 ve 20 dakika pişirilmiştir.

220°C-10 dk 220°C-15 dk 220°C-20 dk

250°C’de roll ekmekler 7, 11 ve 15 dakika pişirilmiştir.

250°C-7 dk 250°C-11 dk 250°C-15 dk

280°C’de roll ekmekler 5, 10 ve 15 dakika pişirilmiştir.

280°C-5 dk 280°C-10 dk 280°C-15 dk